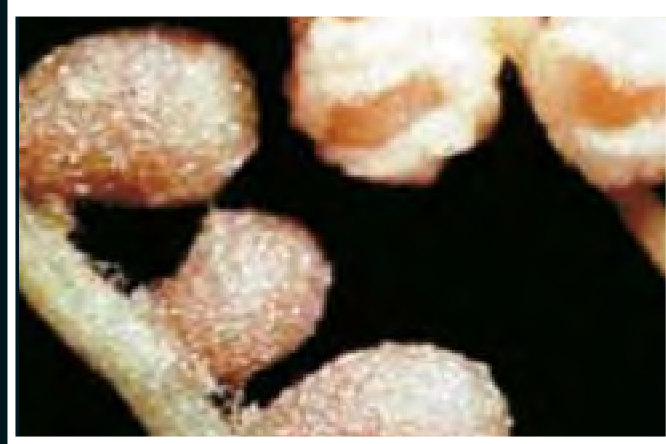


Lillian Frioni es profesora de Microbiología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República, de Montevideo, Uruguay, responsable de la Unidad Asociada Ecología Microbiana de la Facultad de Ciencias, de la misma Universidad, e investigadora del PEDECIBA (Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas).
Trabajó por más de diez años en la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto y en la de Rosario (Santa Fe) y colaboró también con la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad Nacional de Córdoba, en Argentina.
Integró en numerosas oportunidades la Comisión Directiva de la Sociedad Uruguaya de Microbiología (SUM).
Realizó estudios en la Universidad de la República (Uruguay), en la Universidad d´Orsay y en el Instituto Pasteur (Paris), en el Centro de Pedología Biológica de Nancy (Francia), y en el Laboratorio de Sistemas Simbióticos Fijadores de Nitrógeno Tropicales de Nogent sur Marne, Francia.
Microbiología, Básica, ambiental y agrícola es su tercer texto. El primero *Ecología microbiana del suelo*, fue editado en 1990 por la Universidad de la República, de Uruguay, luego de obtener un premio de la Colección Reencuentro. El segundo, *Procesos microbianos*, fue editado en 1999 por la Fundación de la Universidad Nacional de Río Cuarto (Argentina).

ISBN: 9974-0-0290-7



Microbiología Básica, ambiental y agrícola

Microbiología

Básica, ambiental y agrícola



Lillian Frioni / Facultad de Agronomía
Universidad de la República, Uruguay 2005

Microbiología:

básica, ambiental y agrícola

Lillian Frioni

Contacto: lfrioni@fagro.edu.uy, Fax: 598 2 359 04 36

DEPOSITO LEGAL: 330.113/06
ISBN: 9974-0-0290-7
FOTOS DE TAPA: P. Izaguirre, *Peltophorum dubium* (Ibirapitá) y *Bauhinia foficata* (Pata de vaca)
DISEÑO DE TAPA: Javier Santiago
DISEÑO, ARMADO E IMPRESIÓN: Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República Oriental del Uruguay. Avda. Garzón 780, 12900 Montevideo -URUGUAY

Tabla de contenidos

Los microorganismos en los alimentos y la industria

Los microorganismos y la protección ambiental

Microbiología, básica, ambiental y agrícola
Lillian Frioni- Editorial de la Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay-2006

Fe de erratas

Tabla de contenidos: Algunos capítulos presentan una numeración de página que no corresponde.

Capítulo	Página	Capítulo	Página
1	11	15	255
2	19	16	291
8	121	17	309
9	143	18	323
10	169	19	341
11	191	20	357
12	211	21	373
13	231	22	393
14	243	23	407
		Anexo Práctico	417

Página	donde dice	debe decir
9	Los protistas superiores	Los microorganismos eucariotas
13	Protistas inferiores	Procariotas
27	Texto: La figura 12 presenta la ultraestructura de una endospora al microscopio electrónico	La figura 12 presenta la morfología de bacilos capsulados y esporulados
28	Figura 12- Ultraestructura de una endospora bacteriana y bacilos esporulados y capsulados	Morfología de bacilos esporulados y capsulados
42	Cuadro 4 heterótrofos → compuestos inorgánicos	heterótrofos → compuestos orgánicos
52	Fermentación alcohólica: se realiza en el músculo y….	Eliminar subrayado. Es: Los microorganismos activos son sobre todo los hongos……
57	Debajo del Cuadro 21: El CO_2 (carbonatos) actúa como donador y el H_2 como aceptor de electrones….	El H_2 actúa como donador y el CO_2 como aceptor de electrones
105	Los protistas superiores	Se estila más referirlos como : Microorganismos eucariotas

115	Zygomycetes: micelio cenocítico o septado bien desarrollado.	eliminar: septado bien desarrollado
141	Cuadro 11: • Bacterias aerobias/desnitrificantes	• Bacterias aerobias/nitrificantes
150	Cuadro 10 Hongos celulolíticos : Ascomycetes	Hongos celulolíticos son: Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes y Deuteromycetes
300	El endofito….y Endogonales (flias. Gigasporaceae y Endogonaceae)	Endogonales (flia. Endogonaceae). Eliminar Gigasporaceae
315	antibióticos o toxinas específicas como bacteriocinas	Sacar lo subrayado
422	Técnica coloración de Gram: se omitió el 5º paso: decoloración (luego del tratamiento con Lugol)	Decolorar con alcohol-cetona (2/1 vol/vol) suavemente con ayuda de agua hasta que el frotis se vea limpio.

Prólogo

Microbiología: básica, ambiental y agrícola surge luego de revisión y ampliación de *Procesos microbianos*, editado en 1999 por la Fundación de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina, texto que continuó a *Ecología microbiana del Suelo*, editado en 1990 por el Departamento de Publicaciones de la Universidad de la República (Uruguay).
En todos ellos se analizan actividades de los microorganismos que benefician al hombre y mejoran la calidad de los ecosistemas naturales, cuyo conocimiento permite manejarlas y dirigirlas en beneficio de la población. En efecto, muchas actividades microbianas permiten incrementar la producción de alimentos, la salud de los suelos y de los cauces de agua, evitando o disminuyendo las aplicaciones masivas de fertilizantes y sustancias altamente tóxicas como herbicidas, fungicidas, etc.
Debemos, sin embargo señalar las diferencias entre los tres textos: en *Ecología microbiana del suelo*, se analizaron las transformaciones de la materia orgánica y mineral de los suelos, las interacciones de los microorganismos entre si y con los vegetales, con énfasis en dos importantes asociaciones simbióticas, las fijadoras de nitrógeno y las asociaciones con hongos micorrícicos.
En *Procesos microbianos* se agregaron temas vinculados a los procesos de biodegradación de restos orgánicos, tanto aerobios como anaerobios que contribuyen a la conversión de materiales de deshecho de la industria láctea, de otras agroindustrias y de prácticas agrícolas, en productos que se usan como biofertilizantes y obtener efluentes de la industria sin carácter contaminante, contribuyendo a la protección ambiental. Otra temática abordada en este segundo texto es la promoción del crecimiento vegetal, tanto en forma directa, por procesos microbianos de mineralización, oxido-reducción, solubilización, fijación, como por su contribución a la eliminación de microorganismos fitopatógenos por mecanismos conocidos como Control Biológico.
Finalmente, en el presente texto *Microbiología: básica, ambiental y agrícola,* además de revisarse y actualizarse estos temas, se entendió oportuno incorporar capítulos dedicados a aspectos de Microbiología General o Básica, en el entendimiento de que muchas veces resulta dificultoso a los estudiantes de Agronomía, de Ciencias del Suelo o de Ciencias Ambientales, acceder a los excelentes textos que sobre el tema están publicados.
Se continuó una interesante experiencia de coordinación realizada entre el 2000 y el 2002 por los docentes de Microbiología de las 7 Facultades de Uruguay que imparten conceptos de Microbiología en la que se delimitaron los conceptos básicos que deberían contener un curso común de Microbiología General, a aplicar en cada uno de esos centros, que está disponible en CD. Sobre esta experiencia se desarrollaron los capítulos del 1 al 7 del presente texto.
Otras temáticas abordadas en este texto son el de Biorremediación, o sea el tratamiento microbiológico de situaciones de polución graves, como las que lamentablemente nos tiene acostumbrados la prensa: derrames de petróleo, contaminaciones por solventes, herbicidas, etc. y el de la aplicación biotecnológica de muchos microorganismos.
El Anexo práctico contiene como en los textos anteriores, técnicas básicas para realizar experiencias sencillas y poner en evidencia los procesos microbiológicos tratados en el texto.

Por último, se desea dedicar este texto a los estudiantes de distintas disciplinas: Agrícolas, Biológicas, de Ciencias Ambientales, Ciencias del Suelo, Bioquímica y Química, que sientan interés en adentrarse en el apasionante mundo de los microorganismos.

Los microorganismos: estructuras y funciones

1 Introducción a la Microbiología

La Microbiología es la ciencia que estudia a los microorganismos que constituyen un importante grupo de organismos primitivos y simples, la mayoría unicelulares microscópicos y otros macroscópicos filamentosos o cenocíticos, capaces de realizar innumerables procesos biológicos, que han surgido muy temprano en la evolución, pero que se han adaptado a las condiciones ambientales actuales.

El grupo está integrado por las bacterias, algas, hongos, protozoos (figura 1).

Los virus no se consideran microorganismos en sentido estricto, ya que no poseen estructura celular, presentan una sola molécula de ácido nucleico, carecen de actividad metabólica (excepto la enzima lisozima) y son incapaces de reproducirse por si mismos. Se les denomina: entidades biológicas.

La Microbiología estudia:
i) células vivas y su funcionamiento
ii) los microorganismos, importante grupo capaz de existencia independiente
iii) diversidad microbiana y evolución
iv) funciones en la biosfera, en nuestro organismo, en el de los vegetales y animales

El cuadro 1 presenta la clásica división de la disciplina en Microbiología General y Microbiología Aplicada y el cuadro 2 resume algunos de los efectos de los microorganismos en las actividades humanas.

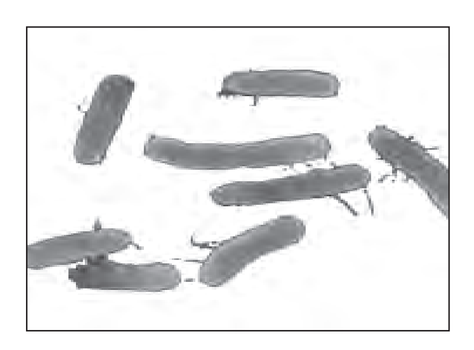





Figura 1- Bacterias, hongos, algas y protozoos

Cuadro 1- Aspectos que estudia la Microbiología

Microbiología general: herramienta para la comprensión de principios metabólicos generales, genética, división celular.

Estudia: los microorganismos, su estructura, fisiología, clasificación, diversidad, procesos bioquímicos, crecimiento y su control

Microbiología aplicada: relacionada a problemas de la medicina, ambiente, industria, producción y conservación de alimentos, transformaciones de la materia orgánica y mineral en ecosistemas naturales, generación de energía, protección del ambiente, biotecnología

Los organismos cumplen con los 5 principios característicos de las células vivas:

1. autoalimentación o nutrición: las células toman las sustancias químicas del ambiente, las transforman, liberan energía y productos de desecho.

2. autoduplicación o desarrollo: las células son capaces de dirigir su propia síntesis. Al crecer, se dividen dando dos células cada una idéntica a la original.

3. diferenciación: la mayor parte de las células pueden presentar cambios en su forma o función. La diferenciación suele ser parte del ciclo de vida celular: se forman estructuras especializadas comprometidas con la reproducción sexual, la dispersión, la sobrevivencia en condiciones desfavorables (esporas, cistos,etc).

4. señalamiento químico: interactúan o se comunican con otras células, por señales químicas

5. evolución: es la introducción de cambios hereditarios como resultado de la selección natural. Consecuencia de estos cambios (que ocurren a velocidad baja pero regular en todas las células) es la selección de los organismos mejor capacitados para vivir en determinado ambiente.

Los estudios con el microscopio electrónico permitieron reconocer diferencias en la organización subcelular de los organismos y confirmar la existencia de dos tipos de células: la **eucariótica,** unidad estructural de animales, vegetales, protozoos, hongos y algas y la **procariótica**, característica de los organismos más simples, las bacterias, incluyendo entre éstas a las cianobacterias (figura 2).

A pesar de la extraordinaria diversidad de células **eucarióticas**, resultante de la especialización evolutiva de los distintos grupos, su arquitectura básica es común: compartimentalización por sistemas membranosos (RE y Golgi), corrientes citoplasmáticas, mitocondrias y cloroplastos. El núcleo de los eucariotes está rodeado por una membrana

Cuadro 2- Impacto de los microorganismos en la actividad humana

Como agentes causantes de enfermedades

La mayoría de los microorganismos están bajo control. Sin embargo, en ciertas condiciones las enfermedades microbianas constituyen causa de morbilidad y muerte

Benéficos: productores de antibióticos (100ton/año)

En la agricultura

Fijación biológica del N_2 (175 millones toneladas N/año)

Transformaciones de elementos: C, N. S, P, K, etc.

Actividades microbianas en el rumen

Enfermedades de plantas (hongos, bacterias) y su Control Biológico

Energía y protección del ambiente

Biocombustibles: etanol, H_2, metano

Polímeros biodegradables: polialcanos (β OH-butirato)

Recuperación de minerales de suelos de minas

Alimentos

Conservación de alimentos (fermentaciones ácidas)

Fermentaciones láctica y alcohólica

Biotecnología

Organismos genéticamente modificados de interés

Producción de compuestos farmacéuticos

Herramientas para la transferencia de genes (seleccionados o creados)

nuclear, contiene varias moléculas de ADN y se divide por **mitosis** o por una completa reproducción sexual, que incluye fusión de células, formación de zigote diploide y segregación de células haploides luego de la **meiosis.**

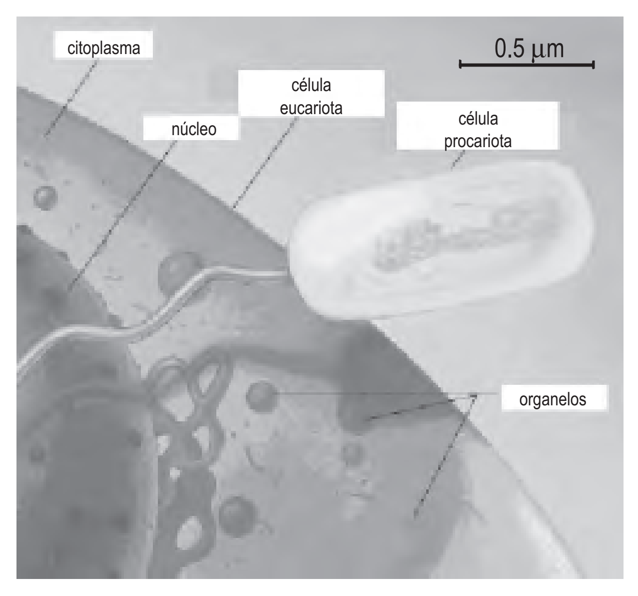


Figura 2- Relaciones entre las células procariotas y las eucariotas

La **célula procariota**, por el contrario, no posee membrana nuclear, posee una sola molécula de ADN y la división asexual es por bipartición, **amitótica**. La célula no está atravesada por membranas, no posee organelos, excepto sacos muy simples que alberguen a los pigmentos fotosintéticos y a veces vesículas de gas para flotar en el agua.

Los estudios a nivel de funciones celulares mostraron que estas diferencias estructurales son la expresión de mecanismos diferentes de:

- transmisión de la información genética
- tipos de metabolismo bioenergético
- procesos de entrada y salida de sustancias

Uno de los hechos más sorprendentes en la historia de la evolución debe ser sin duda la aparición de la primera célula eucariótica. Se está lejos de comprender las causas de este gran salto en la evolución, sobre todo por la escasez de fósiles, que permitan reconocer intermediarios.

Ya desde la segunda mitad del siglo XIX se vislumbraban diferencias entre animales y vegetales con los organismos más simples, como las bacterias, hongos, algas y protozoos.

El zoólogo alemán Haeckel propuso en 1886 incluir a estos últimos organismos en un nuevo reino, el de los **Protistas**: integrado por organismos muy simples, la mayoría unicelulares, microscópicos, y otros macroscópicos filamentosos o cenocíticos (tubos con paredes rígidas con citoplasma y núcleos que fluyen libremente), conocidos vulgarmente como **microorganismos**.

No se diferencian en tejidos ni órganos, ni presentan especialización funcional, excepto, tal vez, para la reproducción.

Luego de la evidencia de la existencia de los dos tipos de células, el reino de los protistas se dividió en:

Protistas inferiores, con célula procariota, que incluye a las bacterias, con las cianobacterias y actinomicetes y

Protistas superiores, con estructura eucariota, que comprende a las algas, protozoos y hongos.

A los virus les faltan muchos de los atributos de las células entre los cuales el más importante es que no son sistemas abiertos dinámicos. Una partícula viral es una estructura estática, incapaz de cambiar o reponer sus partes. Carecen de organización celular, de capacidad metabólica y de autoduplicación, no se los considera microorganismos, sino **entidades biológicas** y serán tratados en el capítulo de genética de procariotas, por el rol que ejercen en la transferencia de material genético.

Evolución y diversidad microbiana

Se calcula que nuestro planeta tiene una antigüedad de 4.600 millones de años y se han descubierto restos fósiles de células bacterianas de unos 3.500 a 3.800 millones de años, por lo que se infiere que la vida procariota surgió poco después del enfriamiento terrestre.

Se postula a un hongo hemiascomicete como el primer organismo eucariota, que fue adquiriendo los 22 caracteres universalmente presentes en los eucariotas y ausen-

tes en los procariotas, originado a partir de una bacteria aerobia. Esta hipótesis se contradice con la creencia general de que este organismo primitivo fuera una cianobacteria. Estas bacterias y la fotosíntesis productora de oxígeno se desarrollaron probablemente hace unos 2.500 a 3.000 millones de años. La diversidad microbiana aumentó en forma notable luego de la aparición del O_2.

La figura 3 muestra un esquema de la evolución del mundo vivo basado en la estructura del ARN de los ribosomas. Desde el punto de vista evolutivo los organismos se pueden dividir en tres grupos principales: **arqueobacterias, eubacterias y eucariotas.**

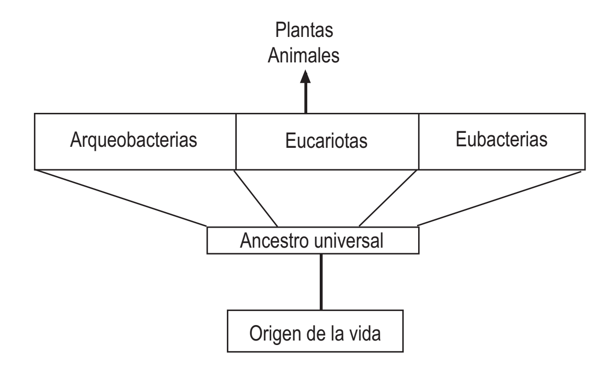


Figura 3- Evolución del mundo vivo basada en la estructura del ARN de los ribosomas

Aunque las eubacterias y las arqueobacterias son procariotas, desde un punto de vista evolutivo no están más estrechamente relacionadas entre si como lo están con los eucariotas.

Las arqueobacterias (***Archaeae***) comprenden un grupo muy primitivo que incluye organismos halófitos y termófilos extremos. Entre ellas se encuentran las bacterias metanogénicas, anaerobias estrictas.

Parecería que los tres grupos bacterianos surgieron temprano en la historia de la tierra a partir de un organismo primitivo común, el **«ancestro universal»**.

Debido a que las células de los animales y de las plantas son eucariotas, se ha considerado en forma general que han derivado de algún tipo de microorganismo, en tanto que los procariotas representan una rama que nunca superó la etapa microbiana.

Los estudios sobre las secuencias del ARN ribosomal en células procariotas sugiere una separación temprana de estos organismos. La figura 4 (Madigan *et al*., 2000)presenta el arreglo según estos criterios basados en la organización genética. El árbol filogenético se divide en tres ramas principales: *Bacteria, Archaea y Eucarya*. Las arqueobacterias y las bacterias fueron las primeras en diverger y luego se desarrollaron los organismos eucariotas. Estos tres grupos primarios se denominan **dominios** o imperios y se ubican por encima del nivel de los reinos clásicos.

Los organismos eucariotas presentan lípidos con acil diésteres del glicerol y ARN ribosomal eucariota y pertenecen a *Eucarya*. El dominio *Bacteria (Eubacteria)* presenta organismos con células procariotas con lípidos de membrana con diacil diéster de glicerol, mientras que los procariotas cuyas membranas están compuestas por lípidos isoprenoides del tipo diéter de diglicerol o tetraéter de diglecerol y ARNr arqueobacteriano comprenden el tercer dominio, *Archaea,* que incluye a organismos termófilos, anaerobios y acidófilos.

Parece probable que las células eucariotas modernas se originaron a partir de las procariotas hace unos 1.400 millones de años. Los mecanismos no están aun dilucidados.

Una de la hipótesis es la **endosimbiótica,** que piensa que la célula eucariota ancestral se pudo formar por la fusión de antiguas eubacterias y arqueobacterias. Muchos autores consideran que *Archaea* y *Eucarya* están más relacionados de los que parece y proponen que la línea eucariota surgió de *Archaea* y luego se formó el núcleo, posiblemente a partir del aparato de Golgi. Las mitocondrias y los cloroplastos parecen haber surgido con posterioridad.

El eucariota ancestral fermentador de vida libre con su núcleo estableció relaciones simbióticas permanentes con bacterias fotosintéticas (cianobacterias) que evolucionaron hacia los cloroplastos. Eubacterias con respiración aerobia (*Agrobacterium, Rhizobium*, rickettsias) serían los antecesores de las mipocondrias.

Esta teoría endosimbiótica ha sido avalada por el hallazgo de una cianobacteria endosimbiótica en un protozoo diflagelado y que actúa como su cloroplasto.

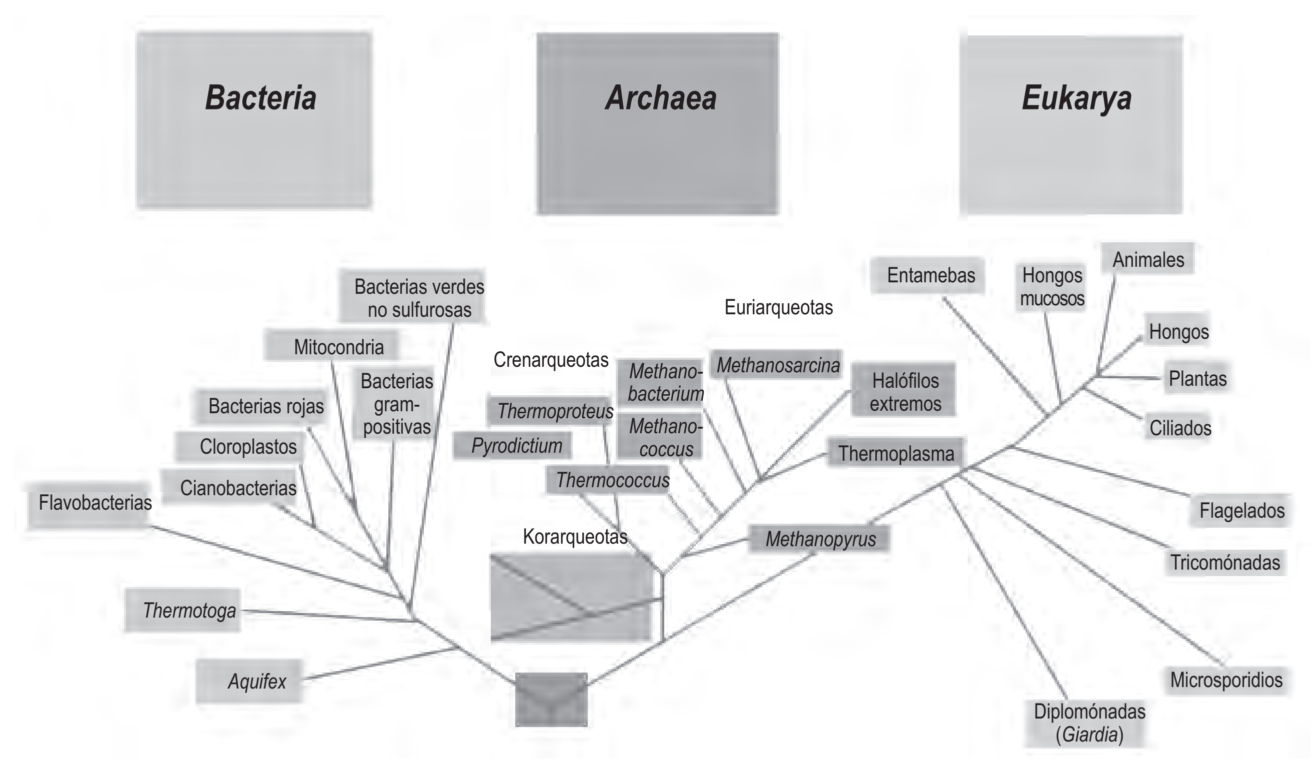


Figura 4- *Bacteria, Archae y Eukarya*

Es posible que nuevos datos ayuden a dilucidar este proceso evolutivo.

Técnicas de estudio de los microorganismos

La mayor limitación en el estudio de los microorganismos lo constituye su pequeño tamaño, la falta de fósiles y la dificultad de muchos de los microorganismos para ser cultivados en el laboratorio. Sin embargo, los avances en los últimos 100 años fueron enormes y el cuadro 3 resume algunos de los eventos más importantes.

Microscopía

El microscopio marcó un hito en los estudios, ya que hay que considerar que el ojo desnudo aprecia como independientes a dos puntos separados por 0,1mm (poder separador) y el mejor microscopio óptico presenta un límite de resolución de 0,2 µm y un aumento máximo de 1.500-2000X, que resulta de multiplicar el aumento del ocular (10-20X) por el del objetivo (5, 10, 20 aumentos, los comunes y x 100, el objetivo de inmersión en aceite).

Como las bacterias presentan aproximadamente un diámetro de 1 µm, con los microscopios ópticos sólo se pueden apreciar la forma general y las características morfológicas principales, pero no se aprecian estructuras subcelulares.

Se emplean también microscopios de contraste de fases y los fluorescentes, que permiten distinguir estructuras en base al empleo de colorantes fluorescentes, como el naranja de acridina, diacetato de fluoresceína etc. Muchos de ellos se consideran colorantes vitales, ya que fluorescen en luz ultravioleta luego de ser empleados por enzimas celulares.

La estructura interna detallada de los microorganismos fue visible con el microscopio electrónico, desarrollado a partir de la década del 30 del siglo XX y que presenta un poder separador aproximadamente 1000 veces superior al del microscopio óptico y puede distinguir puntos separados por 0,5nm (aumento eficaz 100.000X). Se emplean los microscopios electrónicos de transmisión y de barrido (figura 5).



Figura 5- Microscópica electrónica.
Izquierda: *Rhizobium* observado con microscopio electrónico de transmisión, se aprecia la membrana y la pared celular , la región nuclear y gotas lipídicas (materiales de reserva).
Derecha: micrografía de *Lactobacillus* spp. con microscopía electrónica de barrido.

El primero permite visualizar estructuras dentro de la célula, así como características de la membrana y pared celular, por la diferencia de densidades al ser atravesadas por un flujo acelerado de electrones. El de barrido muestra el relieve de superficies celulares ya que los electrones se reflejan luego de chocar con una superficie metálica que recubre los preparados.

Tinciones

Los microorganismos vivos se pueden examinar directamente con un microscopio óptico, práctica corriente en estudios de morfología de hongos, algas y protozoos (figura 6).

En el caso de las bacterias, dado su pequeño tamaño y la falta de contraste con el medio, esta técnica de observación es menos usada.

Sin embargo, es muy empleada para evidenciar la movilidad bacteriana, con cultivos jóvenes en medio líquido, en el microscopio óptico, ya que los flagelos son difíciles de observar aun con tinciones especiales. Se coloca una gota de cultivo entre porta y cubre objeto o en portaobjetos especiales excavados, que se observan con baja luminosidad ya que existe poco contraste entre las células y el agua, lo que dificulta la observación.

En general los microorganismos son fijados **(frotis)** y teñidos con colorantes ácidos o básicos a los efectos de aumentar su visibilidad y/o conservarlos para otros estudios.

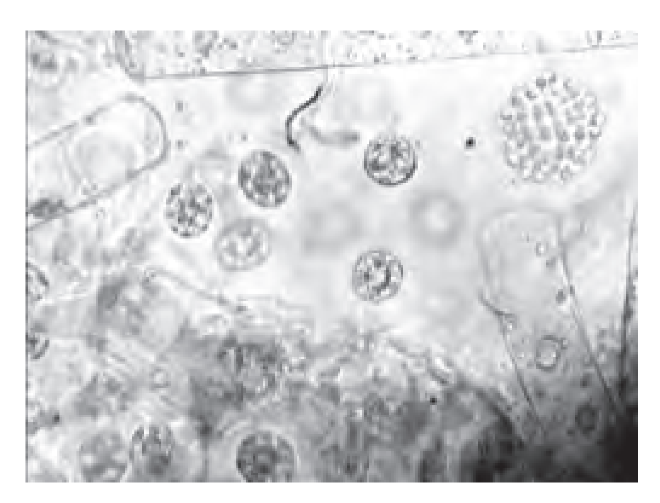
Fijación: se realiza en general secando suavemente el inóculo sobre el portaobjeto a la llama y luego cortando varias veces la llama con el preparado. El objetivo es conservar las estructuras lo más intactas posibles antes de su tinción. La fijación puede realizarse con sustancias químicas, como el etanol, ácido acético, formaldehído, que inactivan e insolubilizan moléculas como los lípidos y proteínas microbianas.

Coloraciones: numerosos colorantes se emplean para facilitar la visualización de los microorganismos más pequeños, como las bacterias (figura 6). Presentan grupos cromóforos, con dobles enlaces que le dan el color característico y además se unen a estructuras celulares por enlaces iónicos, covalentes o hidrofóbicos. Los colorantes básicos, como el azul de metileno, la fucsina básica, el cristal violeta, la safranina, verde de malaquita, tienen grupos cargados positivamente que se unen a moléculas cargadas negativamente, como los ácidos nucleicos y muchas proteínas (superficies bacterianas). Los colorantes ácidos, como la eosina, rosa de Bengala y fucscina ácida son aniónicos y se unen a grupos celulares cargados positivamente.

Los microorganismos se pueden observar al microscopio luego de una **tinción simple**, es decir un solo colorante, por ejemplo con azul de metileno: se cubre el frotis con el colorante, por un tiempo prudencial, 1 minuto, se lava con agua, se seca y se observa. Permiten distinguir tamaño, forma y organización de bacterias.

Los métodos de **tinción diferencial** permiten diferenciar grupos bacterianos según sus propiedades de tinción. Ejemplo de estas es la tinción de Gram, que separa a bacterias Gram positivas (toman el primer colorante y lo retienen y se ven violetas) y Gram negativas, que no retienen el colorante violeta luego de lavado con etanol o acetona y se colorean con el colorante de contraste, rosado, como la safranina.

Existen otro grupo de tinciones que permiten visualizar estructuras como esporas, flagelos, materiales de reserva, etc.



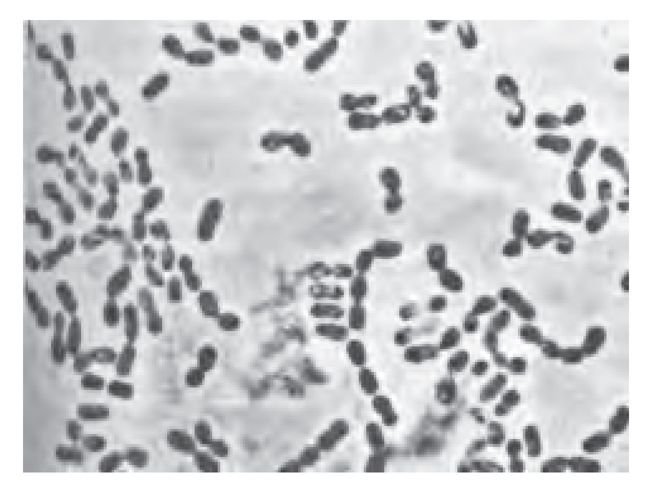


Figura 6- Observaciones de microorganismos al microcopio óptico. Izquierda: algas al estado fresco y derecha: bacilos luego de tinción

Otros métodos de estudio de los microorganismos
Numerosos métodos son empleados para el estudio de estructuras subcelulares de los microorganismos y para distinguir cepas bacterianas. Muchos de ellos son adaptaciones de técnicas corrientes en biología celular: coloraciones diferenciales y observaciones microscópicas (citoquímica), estudios enzimáticos, evidencia de vías metabólicas y finalmente los mayores avances se realizaron por aplicación de métodos de biología molecular. Muchos de ellos son descriptos en el capítulo 8: Ecología microbiana y en el Apéndice práctico.

Como resumen, en el cuadro 3 se señalan algunos de los descubrimientos más importantes que contribuyeron a la evolución de la Microbiología.

Bibliografía

Madigan, Martinko y Parker. **Brock, Biología de los microorganismos,** 9ª. Edición, 2000 Prentice Hall International

Prescott, Harley, Klein, **Microbiología**, 1999 McGraw-Hill Interamericana

Preguntas de repaso

1) Objeto de estudio de la Microbiología
2) Disciplinas muy relacionadas a la microbiología
3) Algunas de las especialidades en que se ha subdividido esta ciencia
4) Concepto del término microorganismo y ejemplos de ellos
5) Por qué se dice que los microorganismos son muy buenas herramientas en estudios fisiológicos, genéticos, enzimáticos?
6) Por qué las bacterias están tan distribuidas en la naturaleza? Señale ambientes donde se las encuentra.
7) Cual fue el gran descubrimiento que permitió separar a los microorganismos en dos grandes grupos? Con qué instrumento se logró este hallazgo?
8) Diferencias entre bacteria, arquebacteria y eucariotas
9) Por qué resulta importante la tinción de los frotis bacterianos antes de su observación microscópica?
10) Por qué aun no se tiene certeza definitiva sobre la evolución del mundo microbiano? Qué herramientas resultan muy importantes de aplicar?

Cuadro 3- Breve historia de la Microbiología

1660 Robert Hooke describe estructuras de hongos

1632-1723 Anton van Leeuwwenhoek, Alemania, publica dibujos de microorganismos vistos por un microscopio simple, con un solo lente (300 aumentos)

Siglo 19: Desarrollo de microscopios más potentes, poder separador 0,2 mm

Segunda mitad siglo 19: desarrollo acelerado de la Microbiología

Discusiones sobre dos temas fundamentales:

Existe la generación espontánea?

Cúal es la naturaleza de las enfermedades contagiosas?

1822-1895 Luis Pasteur en Francia, determinó la naturaleza microbiana de contaminaciones de infusiones, el metabolismo anaerobio, la inmunización

1876 Robert Koch en Alemania: los microorganismos como causantes de enfermedad del ganado provocado por *Bacillus anthracis* (antrax)

Postulados de Koch

- El microorganismos causal debe estar presente en cada caso de enfermedad pero ausente en organismos sanos
- El agente infeccioso debe poder aislarse en cultivo puro
- Debe ser capaz de reproducir los síntomas de la enfermedad al inocularse en una planta o animal sano
- Debe poder reaislarse en cultivo puro a partir del huésped enfermo y reconocerse idéntico al primer aislamiento

1886 Haeckel en Alemania: se propone el Reino de los Protistas. John Tyndall en Inglaterra, endosporas resistentes al calor: técnica de esterilización por calor fraccionado (tindalización) Ferdinand Cohn en Alemania: Métodos de esterilización más eficaces

1928 Griffith: Descubrimiento de la transformación

1933 Primer Microscopio electrónico de transmisión

1953 Estructura doble hélice del ADN - Watson y Crick

1977 Reconocimiento de Archeobacterias como grupo

1984 Desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa

1986 Primera vacuna producida por Ingeniería Genética

1996 Se obtiene la secuencia del genoma de *Haemophilus influenzae*

Hasta la fecha han ocurrido innumerables avances en Biología Molecular, Biotecnología, incluida la secuenciación del genoma humano, a la que han contribuido los microorganismos.

2 Estructuras y funciones de las células eucariotas y procariotas Los virus

Organización de la célula procariota

A pesar de su simplicidad se reconocen ciertas estructuras en la célula procariota. El cuadro 1 las describe y resume sus funciones principales y la figura 1 es un clásico esquema de células procariota y eucariota, con sus componentes principales.

Cuadro 1- Estructuras en células procariotas

	Estructuras permanentes
Pared celular	Da forma a la célula y la protege de la lisis osmótica. Carácter antigénico, permite el libre pasaje de sustancias
Membrana citoplasmática	Barrera permeable selectiva, límite de la célula, transporte activo y pasivo. Alberga las enzimas de procesos metabólicos importantes: respiración, fotosíntesis, señales quimiotáctiles
Citoplasma	Solución coloidal, agua, sales, proteínas y demás componentes, con la membrana forma el protoplasto
Espacio periplasmático	Entre la pared y la membrana, contiene enzimas hidrolíticas y proteínas para la captación de nutrientes
Nucleoide	Molécula de ADN hiper enrrollada, material genético principal
Plásmidos	Moléculas pequeñas de ADN circulares, codifican información secundaria (resistencias)
Ribosomas	Corpúsculos de ARN-proteínas encargados de la síntesis proteica, más pequeños (70S) que los eucariotas (80S)
	Estructuras accesorias (dependen de la especie)
Cápsulas y capas mucosas	Polisacáridos y/o proteínas, resistencia a la fagocitosis, adhesión a superficies
Fimbrias y pilis	Cuerpos proteicos, fijación a superficies, conjugación bacteriana
Flagelos	Proteínas, movimiento, con carácter taxonómico
Endosporas	Estructuras de resistencia a altas temperaturas, radiaciones, etc.
Vacuolas de gas	Permite la flotación en células acuáticas
Inclusiones citoplasmáticas	Sin membrana, o con membrana no unitaria, en el citoplasma, fenoxialcanos (ác.poli β-OH butírico, poli-fosfatos, Sº, etc.)

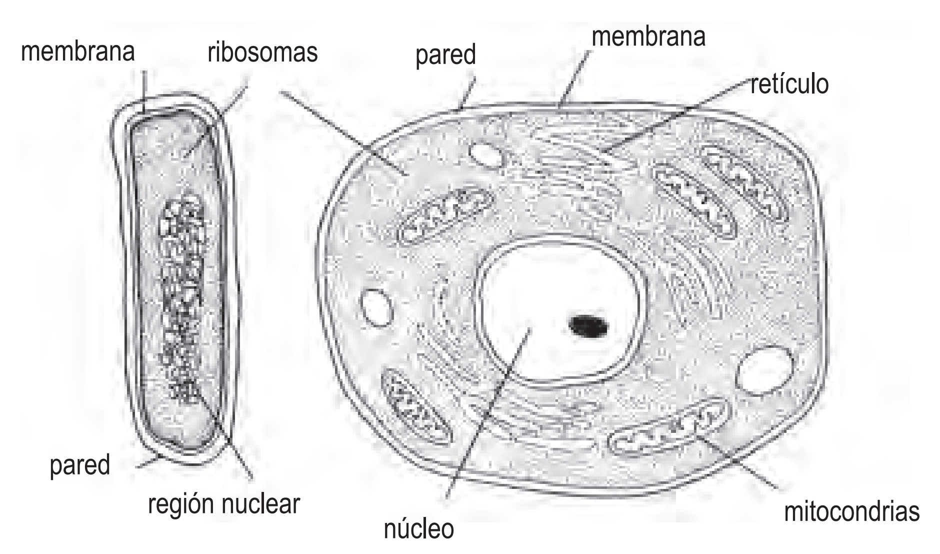


Figura 1- Esquemas de células procariotas y eucariotas

Estructuras permanentes
(de afuera hacia adentro de la célula)

Pared celular

Constituye la parte más importante de la célula procariota ya que salvo algunos micoplasmas y arqueobacterias, parásitas intracelulares, todas las otras bacterias presentan esta barrera de protección contra el ambiente, sin la cual las células sufrirían lisis osmótica en ambientes en general hipo o hipertónicos (suelos, agua, organismos). En 1884, Christian Gram desarrolló la tinción que lleva su nombre y desde entonces, las bacterias se clasifican en dos grupos importantes: Gram negativas y Gram positivas.

La diferencia estructural entre ambos grupos se puso de manifiesto con el microscopio electrónico de transmisión, a mediados del siglo pasado. El cuadro 2 resume las diferencias.

En la figura 2 se observan estas diferencias en la pared de ambos tipos de células y en la figura 3 se aprecia la estructura de esta singular molécula.

La pared de una célula Gram positiva está formada por una gruesa capa de unos 20 a 80 nm de espesor, en general formado por una única molécula de peptidoglicano o mureína, (figura 2), ubicada por fuera de la membrana celular. Esta molécula que no aparece en las células eucariotas, está formada por una malla de polímeros de dos aminoazúcares: N-acetil-glucosamina (NAG) y de ácido N-acetil murámico (NAM) unidas por enlaces β glucosídicos hidrolizados por una enzima conocida como lisozima, contenida en las lágrimas, saliva (mecanismos de defensa primaria contra infecciones microbianas (cuadro 3).

La malla se fortalece aun más con enlaces peptídicos, en general en cadenas de 4 aminoácidos, tres de los cuales

Cuadro 2- Superficies celulares en células Gram positivas y Gram negativas

- Gram positivas: la pared celular posee gruesa capa de peptidoglicano que retiene el colorante específico (violeta)
- Gram negativas: la pared celular presenta capa fina de peptidoglicano y una membrana externa y no retiene el colorante. Se colorean con el segundo colorante, de rosado
- *Archeae*: no presentan peptidoglicano típico, su tinción es Gram positiva o negativa

Periplasma: espacio entre membrana externa de la pared celular y la membrana citoplasmática, contiene numerosas proteínas hidrolíticas

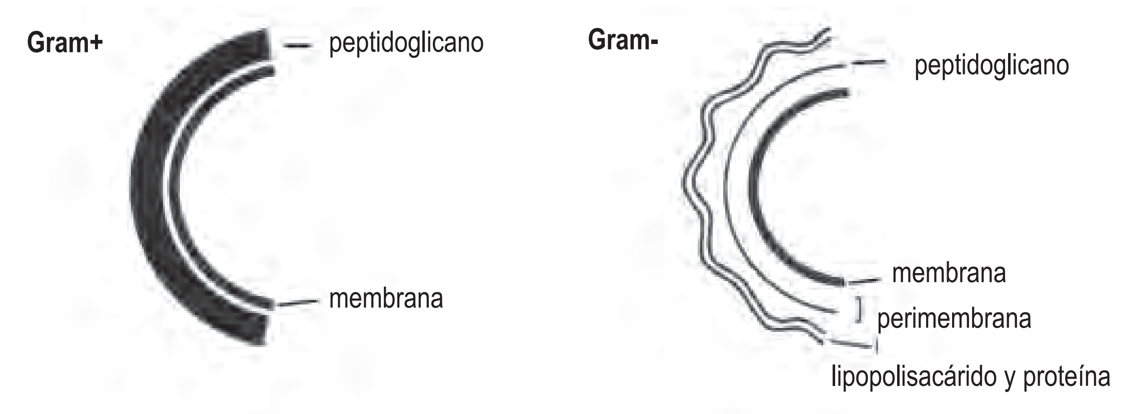


Figura 2- Tipos de paredes procariotas

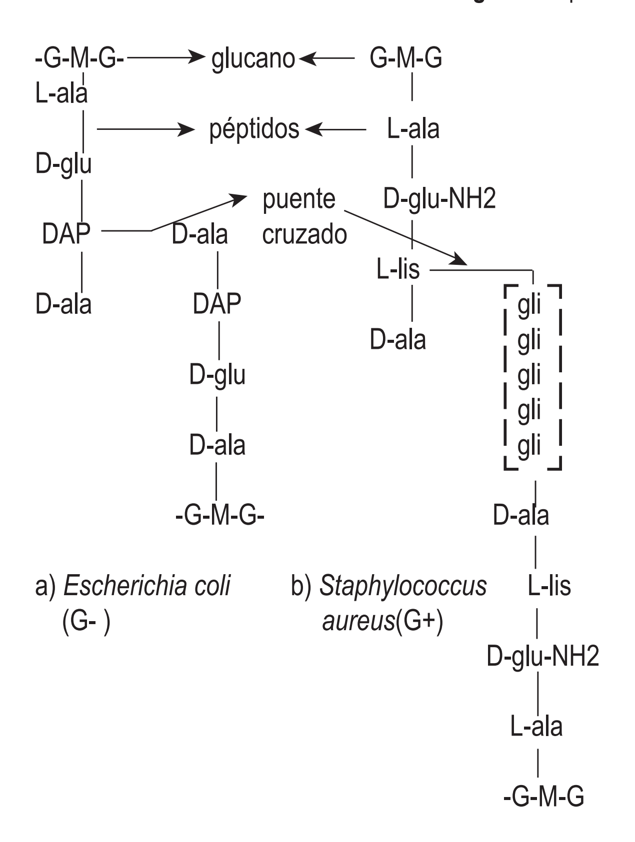


Figura 3- Esquema de la molécula de peptidoglicano

(ácido D-glutámico, D-alanina y ácido meso-diaminopimélico) no están presentes en las proteínas. La cadena peptídica de 4 aminoácidos D y L alternados se conecta a un grupo carboxilo del ácido N-acetilmurámico (figura 4).

La penicilina actúa inhibiendo la incorporación de los aminoácidos al peptidoglicano. Otros componentes de la pared Gram positiva son los ácidos teicoicos (polímeros de glicerol y ribitol unidos por grupo fosfato). Aminoácidos como la D-alanina y azúcares como la glucosa se pueden unir a los grupos glicerol o ribitol y al peptidoglicano por enlaces covalentes con el –OH seis del ácido N-acetil murámico o a los lípidos de la membrana citoplasmática (se denominan entonces ácidos lipoteicoicos) Están cargados negativamente y contribuyen con esas cargas a estabilizar la pared Gram positiva. No están presentes en bacterias Gram negativas y sus funciones no están aun dilucidadas.

Cuadro 3- Características del peptidoglicano

* Cadenas de glicano
    - polímeros lineares de N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetil murámico (NAM)
    - hidrólisis por lisozima
* Entrecruzamiento peptídico
    - unión al ácido N-acetil murámico
    - contiene D y L aminoácidos, inhibición por antibióticos lactámicos (penicilina)
* Funciones
    - confiere forma a la célula, previene la lisis osmótica
    - su porosidad permite el pasaje de nutrientes

La pared de una célula Gram negativa (figura 2) es más compleja, con capa de 2 a 7 nm de grosor formada por peptidoglicano (5-10% del peso total de la pared) y se presenta en forma de gel, más que como una capa compacta. Luego se encuentra la llamada membrana externa

de 7-8 nm constituida por lipopolisacáridos (LPS) con lipoproteínas en la cara interna. Algunas de éstas, llamadas porinas, forman canales de entrada y salida de sustancias de bajo peso molecular.

Otra estructura que pueda dar resistencia a la pared Gram negativa es la zona de adhesión. La membrana externa y la citoplasmática están en contacto directo en muchos lugares (fusión de membranas), por donde pueden pasar sustancias hacia el interior de la célula. Entre la membrana interna y la pared celular (también llamada membrana externa) se encuentra un espacio conocido como periplasma, con muchas proteínas hidrolíticas.

El cuadro 4 compara ambos tipos de paredes bacterianas.

Cuadro 4- Comparaciones entra ambos tipos de paredes procariotas

Gram positiva
- Puede presentar más de 30 capas de peptidoglicano, son altamente sensibles a antibióticos β-lactámicos (penicilina)
- Acidos teicoicos: le confieren carga negativa a la pared (ribitol o glicerol fosfato)
- Acidos lipoproteícos: fijan la pared a la membrana plasmática

Gram negativa
- Membrana externa: capa externa con lipopolisacáridos (LPS), interna unida al peptidoglicano por lipoproteínas
- Porinas, proteínas que permiten pasaje de pequeñas moléculas al periplasma
- Proteínas de enlace periplásmicas que unen nutrientes, interactúan con proteínas de transporte en la membrana facilitando ingreso de nutrientes.

Los lipopolisacáridos (LPS) son importantes componentes de la pared Gram negativa, están formados por lípidos e hidratos de carbono: 1) lípido A; 2) polisacárido central y 3) cadena lateral (O). El lípido A contiene derivados del azúcar glucosamina y está unido a ácidos grasos y fosfatos o polifostatos y se encuentra inmerso en la membrana externa. El resto de la molécula de LPS sobresale de la superficie. El polisacárido central (*core*) está unido al lípido A.

La cadena O (antígeno O) está formada por una cadena de polisacárido que se extiende hacia fuera y su composición varía con la cepa considerada y son reconocidos por anticuerpos del huésped. Pueden mutar con gran facilidad.

Los LPS son importantes ya que protegen al resto de los componentes de la pared frente a un ataque directo del huésped, brindan carga negativa a la superficie celular. El lípido A es a menudo tóxico, de modo que el LPS puede actuar como una endotoxina y provocar algunos de los síntomas de las infecciones por bacterias Gram negativas.

Una bacteria Gram negativa resiste más la lisis osmótica cuando la célula se trata con lisozima, enzima que hidroliza los enlaces β 1-4 del peptidoglicano por mantener la envoltura formada por la capa externa (forman esferoplastos en medio isotónico), el peptidoglicano representa sólo un 15-20% del peso seco de sus paredes. En una célula Gram + cuya pared está formada en un 80% por peptidoglicano, los protoplastos esféricos formados en medio isotónico, estallan al pasar a un medio hipotónico (plasmoptisis) (capítulo 4).

Las paredes de los microorganismos eucariotas cuando están presentes (hongos, algunas algas y protozoos) son más simples, formadas por polímeros de una misma subunidad, como la celulosa, quitina, a veces mineral, con sílice como en las diatomeas (cuadro 5).

Cuadro 5 - Resumen de los constituyentes principales de las paredes microbianas

Tipo de Célula	Constituyentes
Procariota	
eubacterias	
G +	pétidoglicano, ácidos teicoicos
G -	péptidoglicano y lipopolisacárido
arqueobacterias	pseudopeptidoglicano, glucoproteína polisacárido, proteína
Eucariota	
algas	celulosa, hemicelulosa, pectinas, sílice (algunas)
hongos	quitina, otros polisacáridos, celulosa (en algunos)
protozoos	ninguno o sílice, carbonato de calcio

Membrana citoplasmática y citoplasma

La membrana citoplasmática está presente en células procariotas y eucariotas, es responsable de su relación con el ambiente y es la barrera osmótica de la célula. Su composición es lipoproteica, similar en todos los sistemas biológicos por lo que se la denomina membrana universal o unitaria, presenta un espesor de unas 5 a 10 nm.

La mayoría de los lípidos son asimétricos y las porciones polares son hidrófilas e interactúan con el agua, los extremos no polares, o hidófobos son insolubles en agua y tienden a asociarse entre si, propiedades que les permite formar las bicapas en las membranas. La única diferencia encontrada entre membranas de células eu y procariotas en que las últimas carecen de esteroles como el colesterol, aunque se detectaron moléculas pentacíclicas, similares al esterol, llamadas hopanoides, sintetizados a partir de los mismos precursores que los esteroides. Estos compuestos estabilizan la membrana bacteriana.

La membrana de las arqueobacterias difiere en composición con las de las eubacterias: los lípidos poseen enlaces éter en lugar de ésteres para unir los ácidos grasos al glicerol y en lugar de los ácidos grasos poseen compuestos derivados del hidrocarburo isopreno lo que le confiere propiedades diferentes a las del resto de los organismos. Poseen una monocapa lipídica en lugar de una bicapa y están adaptadas a condiciones extremas.

El citoplasma de células procariotas está constituido por la matriz citoplasmática, compuesta fundamentalmente por agua (70%) y se presenta empaquetado con gran número de ribosomas, partículas esféricas formadas por proteínas y ARN y responsables de la síntesis proteica. Son de menor tamaño que los de los eucariotas (70S en lugar de 80S). Sin embargo, los organismos eucariotas presentan ribosomas del tipo bacteriano en sus organelos (mitocondrias, cloroplastos).

El citoplasma bacteriano no presenta organelos membranosos complejos como mitocondrias y cloroplastos, se aprecian a veces estructuras membranosas, como los mesosomas. Constituyen invaginaciones de la membrana plasmática en forma de túbulos, pliegues, vesículas y son más evidentes en bacterias Gram positivas. Algunos investigadores piensan que son artefactos generados por la fijación química para la observación en el microscopio electrónico. Pero como se aprecian también con otras técnicas como la criofractura celular, se piensa que participan en funciones relacionadas a la formación de pared, en la replicación del cromosoma procariota y su posterior distribución en células hijas.

Material genético

La gran diferencia entre células pro y eucariotas lo constituye la organización del material genético. Las procariotas carecen de núcleo típico, rodeado por membrana. La mayor parte del ADN de una bacteria está constituido por una sola molécula de ADN, de doble cadena, muy enrollada (figura 4) (Prescott *et al*., 1999). El material claro a los electrones es el ADN.

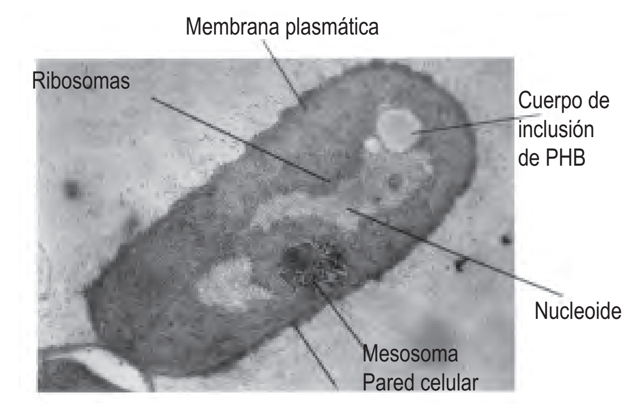


Figura 4- Microfotografía de célula procariota

Se habla de **nucleoide**, falso núcleo, o región nuclear. Muchas veces se lo menciona como "**cromosoma bacteriano**" con la salvedad de que su estructura no es la de un cromosoma eucariota. Esta molécula cerrada, circular, puede apreciarse a veces unido al mesosoma o a la membrana citoplasmática. Contiene un 60% de ADN, algo de ARN y una pequeña cantidad de proteínas, diferentes a las histonas de la célula eucariota y que facilitan su enrollamiento (en *Escherichia coli,* bacilo de 2-6 μm de longitud, el ADN mide aproximadamente 1.400 μm, lo que muestra el grado de enrollamiento de la molécula en el citoplasma).

En procariotas de vida libre contiene unas 1-6 X 10^6 pares de bases (pb), con 1000 a 5000 genes. El cromosoma bacteriano presenta genes esenciales para la vida celular, síntesis de ribosomas, ARN mensajeros, enzimas metabólicas.

Plásmidos: pueden presentarse una o más moléculas pequeñas de ADN en el citoplasma que llevan información no vital para la célula, como resistencias a antibióticos, pesticidas, metales pesados, que pueden perderse y transferir las resistencias a células sensibles que se convierten en resistentes. Son también responsables de la transferencia de material genético de una célula a otra, en la conjugación y son muy empleados en prácticas de ingeniería genética.

Como material genético adicional pueden encontrarse en la célula procariota **fagos temperados** (lisogénicos) y **transposones,** fragmentos de ADN de pocas pares de bases, móviles en la célula y que pueden insertarse en distintos lugares del ADN del nucleoide o de los plásmidos (capítulo 5).

Estructuras accesorias
(del exterior al interior de la célula)

Cápsulas y capas mucosas

Constituyen deposiciones de materiales altamente polimerizados, hidratos de carbono, péptidos, que la célula libera al medio cuando las fuentes exceden a las necesidades de la célula. Las células encapsuladas son resistentes a la fagocitosis por protozoos o glóbulos blancos, en el caso de los patógenos del hombre. También evita la desecación de las células y el ataque por bacteriófagos y sustancias tóxicas y colabora en la adhesión de las células a superficies sólidas, en el mar o a superficies de tejidos en huéspedes animales o vegetales (figura 5) (Madigan *et al*., 2000).

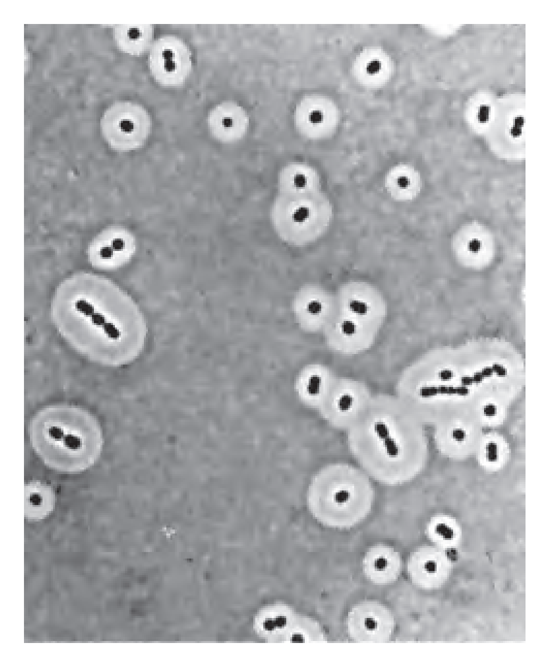


Figura 5- Polisacáridos extracelulares

Cuando esta capa externa está bien organizada y no se lava fácilmente, se habla de cápsula. Si el material es difuso y se elimina fácilmente se denomina capa mucosa. El término gliocalix designa a ambas estructuras. Muchas bacterias G+ y G- y algunas arqueobacterias presentan una capa externa muy organizada llamada capa S, formada por proteínas y glucoproteínas. El de las G- se adhiere directamente a la membrana externa, en las G+ a la superficie del peptidoglicano. Puede proteger a la célula de cambios en el pH, fuerza iónica, enzimas o parásitos microbianos y facilita la adhesión a superficies sólidas.

Apéndices citoplasmáticos

Las bacterias se mueven por flagelos, de estructura más simple que los de las células eucariotas. Están formados por 3 haces de fibrillas de proteínas entrelazadas y un haz central. Son estructuras delgadas, rígidas de unos 20 nm de ancho y hasta 15-20 μm de largo. Deben observarse en microscopio de campo claro, o teñirse con técnicas especiales para aumentar su espesor. La estructura detallada sólo se aprecia en microscopía electrónica (figura 6) (Madigan *et al*., 2000).



Figura 6- Flagelos bacterianos

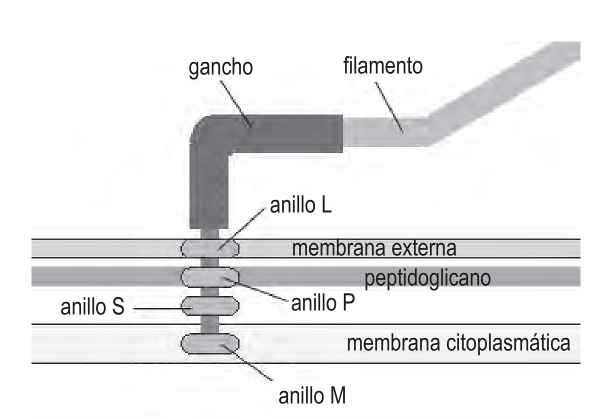


Figura 7- Esquema de la estructura de un flagelo bacteriano

La figura 7 muestra la ultraestructura del flagelo bacteriano, con la parte más larga, el filamento, el gancho de anclaje a la célula y el cuerpo basal, embebido en la célula. En bacterias G- se presentan en este cuerpo basal 4 anillos unidos por una varilla central: el L y P se asocian con el lipopolisacárido de la membrana externa y el peptidoglicano, respectivamente y el anillo interno M se contacta con la membrana plasmática y el gancho, que es un segmento curvo y corto que une el filamento al cuerpo basal, acoplándolo. En bacterias G+ se presentan sólo dos anillos, uno interno relacionado a membrana plasmática y otro externo, vinculado al peptidoglicano.

La flagelina es una proteína flexible cuyo PM varía entre 30 y 60.000. Algunas bacterias poseen una envoltura de lipopolisacárido por fuera, como *Vibrio cholerae*. Mutantes de bacterias con flagelos rectos o con regiones del gancho anormalmente largas, no pueden nadar.

Su presencia y distribución en la célula tiene carácter taxonómico: monotricos (un flagelo), anfitricos (a ambos lados), lofotricos (grupos de flagelos en uno o ambos extremos), peritricos (alrededor de la célula) (figura 8).

Los mecanismos de acción flagelar son provocados por:

- rotación de los anillos en el cuerpo basal, estaría dirigido por gradiente de protones
- rotación antihoraria que produce movimiento hacia delante, con corridas
- rotación horaria que causa cese del movimiento hacia delante, con vueltas de la célula

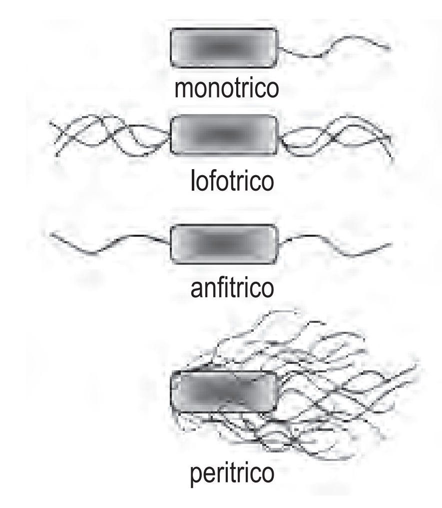


Figura 8- Ubicación de los flagelos en la célula bacteriana

- corridas y vueltas controladas por quimioatrayentes y repelentes

Las **fimbrias** son apéndices similares a los flagelos, pero más cortos y más abundantes (figura 9) (Madigan *et al.*, 2000), no son responsables del desplazamiento celular sino que sirven para adherir a la célula a superficies sólidas. Los pelos son estructuras semejantes a las fimbrias pero más largos, se encuentran pocos en la superficie celular y están relacionados a la transferencia de material genético (plásmidos, segmentos del cromosoma) y en ese caso se llaman pelos sexuales o *pili*.



Figura 9- Fimbrias y *pili* en bacterias

Inclusiones citoplasmáticas

Materiales orgánicos e inorgánicos, visibles a veces al microscopio de luz se encuentran en la matriz citoplasmática. La célula almacena polímeros para evitar las consecuencias de altas presiones osmóticas que le ocasio-

narían lisis celular o cambios bruscos de pH. Algunos inclusiones están rodeadas por una membrana no unitaria de una sola capa de unos 2-4 nm de espesor (azufre, algunos de glicógeno, carboxisomas y vesículas de gas). Se distinguen (figura 10) (Madigan *et al*., 2000):

- gránulos de almacenamiento-polifosfato, fenoxialcanos, como el ácido β-OH butírico (PHB), principal material carbonado de reserva de las células procariotas, azufre en bacterias fotosintéticas anoxigénicas
- vesículas de gas, para la flotación
- membranas que albergan pigmentos fotosintéticos y enzimas respiratorias

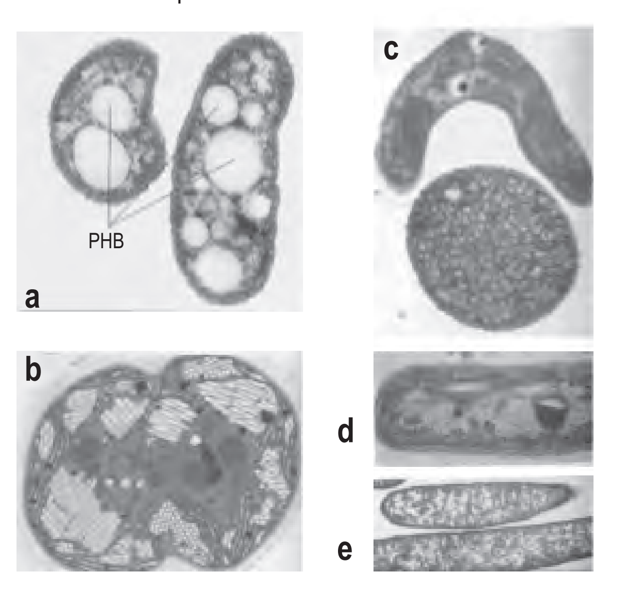


Figura 10- Inclusiones citoplasmáticas
a) Gránulos de lípidos (ácido poli β-OH butírico: PHB)
b) y c) Membrana fotosintética en láminas (bacterias purpúreas)
c) Membrana y vesículas individuales (clorobio) en bacterias purpúreas
d) Clorosomas unidos a la membrana plasmática (bacterias verdes)
e) Bacterioclorofila asociada directamente a la membrana plasmática (*Heliobacterium*)

Sistemas membranosos diferentes a los mesosomas se aprecian en bacterias fotosintéticas como las cianobacterias (vesículas clorobio), en las bacterias fotosintéticas purpúreas y en bacterias nitrificantes (sáculos aplanados) (figura 10). Su función puede ser la de ofrecer una superficie mayor para realizar funciones metabólicas en forma más intensa (localización de pigmentos fotosintéticos, enzimas respiratorias).

El **PHB** es un polímero con moléculas de β-hidroxibutirato unidas por enlaces éster entre los grupos carboxilo e hidroxilo de moléculas adyacentes (figura 10 a). En general se observan en coloraciones al microscopio óptico, y están formados por una sola molécula por célula, evitando la lisis osmótica por acumulación de moléculas monoméricas (alta presión osmótica) y la elevación del pH por los grupos –COOH terminales, que en el polímero se neutralizan por unión éster con grupos hidroxilos. El glicógeno se dispersa más uniformemente en la matriz en gránulos más pequeños y a veces sólo se los aprecia en el microscopio electrónico.

Las cianobacterias acumulan **gránulos de cianoficina**, polipéptidos grandes con cantidades iguales de dos aminoácidos: arginina y ácido aspártico. Se pueden ver con el microscopio de luz y se forman ante exceso de nitrógeno en el medio. Los carboxisomas se presentan como polímeros en forma de gránulos de unos 100 nm de diámetro y se encuentran en algunas cianobacterias, bacterias autótrofas como las nitrificantes y los thiobacilos. Constituyen una reserva de la enzima ribulosa 1-5 bifosfato carboxilasa y pueden ser el lugar de la fijación del CO_2.

Las **vacuolas de gas** se encuentran en cianobacterias, bacterias fotosintéticas purpúreas y verdes y en otras especies acuáticas, lo que les permite flotar cerca de la superficie y alcanzar las cantidades necesarias de luz, O_2 y nutrientes necesarios. Están formadas por las vesículas de gas cuya membrana está formada por proteínas que forman un cilindro rígido impermeable al agua, pero permeable a los gases. Estas pueden colapsar y la bacteria desciende.

Polifosfatos o gránulos de volutina: unidos por enlaces ésteres, constituyen reservas de fosfato y de energía. También se llaman gránulos metacromáticos, por el cambio de color del rojo al azul con azul de metileno o azul de toluidina. Son muy llamativos los gránulos de azufre, amarillos y brillantes que muchas veces llenan el citoplasma de bacterias fotosintéticas sulfurosas.

Endosporas

Cuando las condiciones del ambiente se tornan desfavorables, ciertos géneros de bacterias (*Bacillus, Clostridium, Sporosarcina*) son capaces de formar estructuras terminales o intercalares, llamadas esporas (cuadro 6). Están formadas

de gruesas paredes que la hacen resistentes a radiaciones, desecación, luz UV. El escaso citoplasma se encuentra en un estado "criptobiótico" sin actividad enzimática y muy desecado. Una nueva molécula se sintetiza: el ácido dipicolínico (piridin di benzoico) que forma complejos organo-metálicos o quelatos con metales como el Ca, Mg, etc. impidiendo que actúen como cofactores de enzimas. Este ejemplo de ciclo celular se revierte cuando las condiciones se hacen favorables (humedad, nutrientes, temperatura adecuados). La célula se rehidrata, pierde sus capas externas y el ácido di picolínico y retoma su morfología típica, las funciones fisiológicas y comienza la división celular. Un *shock* térmico breve ayuda a desencadenar estos eventos.

Las esporas constan de una cubierta externa, el exosporio, la corteza, en el espacio entre las dos membranas, donde se acumulan el calcio y el ácido dipicolínico y el protoplasto, en estado criptobiótico.

La figura 11 (Prescott *et al*., 1999). presenta un esquema de la formación de una endospora en un bacilo y la figura 12 presenta la ultraestructura de una endospora al microscopio electrónico.

Luego de una serie de etapas que en *Bacillus megaterium* lleva sólo unas 10 horas, se aprecia en los cultivos las esporas libres, refringentes, sin mucho contraste con el medio.

Cuadro 6- Cáracterísticas de las endosporas bacterianas

- Resistencia al calor, radiación, desecación. Pérdida de agua y síntesis de ácido dipicolínico, que quelata minerales impidiendoles actuar como coenzimas
- Producidas principalmente por los géneros *Bacillus, Clostridium y Sporosarcina*
- Permiten la sobrevivencia en ambientes desfavorables por mucho tiempo
- El ADN está protegido por ácido dipicolínico y proteínas
- Luego de la activación por estrés, *shock* térmico, la disponibilidad de nutrientes dispara la germinación y el crecimiento
- La localización en la célula (terminales, intercalares), se usa como carácter taxonómico

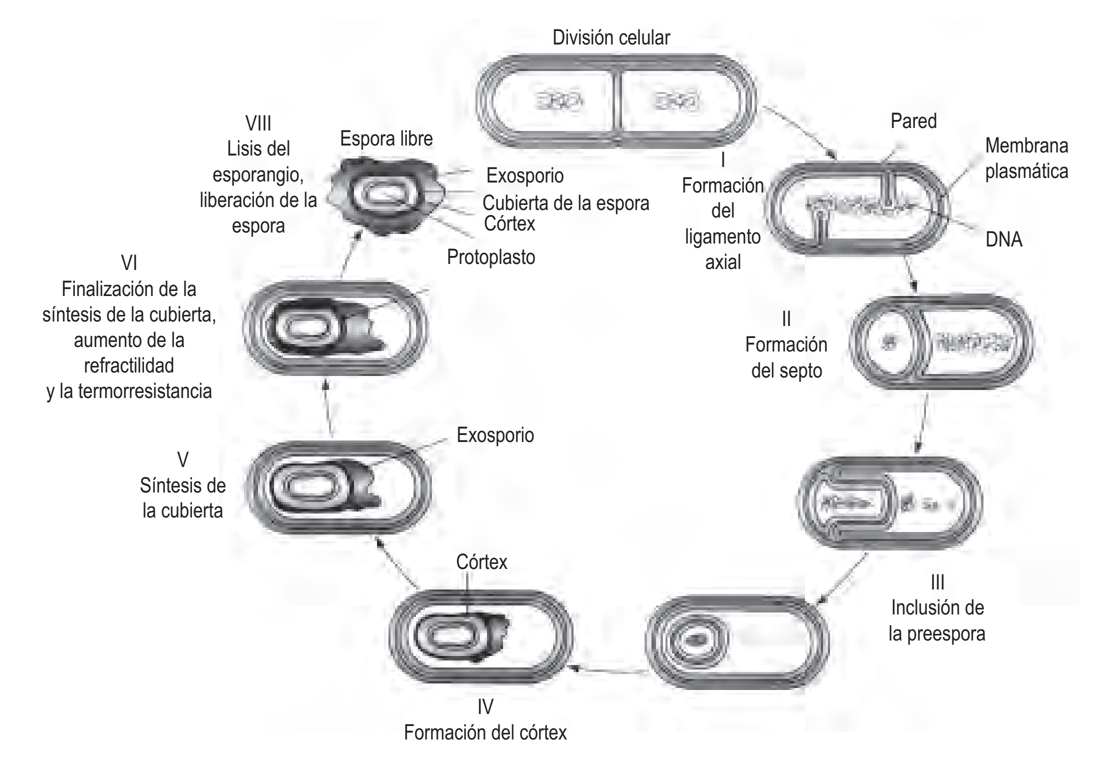


Figura 11- For mación de una endospora bacteriana



Figura 12- Ultraestructura de una endospora bacteriana y bacilos esporulados y capsulados

Organización de la célula eucariota

Las células eucariotas se diferencian principalmente de las procariotas por poseer diversos organelos membranosos complejos en el citoplasma y por contener la mayor parte de su material genético contenido en un núcleo con membrana nuclear.

La presencia de numerosos microtúbulos, microfilamentos confieren a esta célula su forma característica e intervienen además en su movilidad y en el transporte intracelular. El material genético se transmite a las células hijas mediante los procesos de mitosis (asexual) y meiosis (reproducción sexual).

Sin embargo a pesar de estas importantes diferencias y otras debidas al tamaño y morfología de las células, muchas son las similitudes entre ambos tipos de células, sobretodo a nivel metabólico y bioquímico.

Presentaremos una pequeña revisión de este tipo celular (figura 13) que por otra parte ha sido exhaustivamente analizada en cursos previos, por constituir la unidad biológica de los animales, vegetales y de los microorganismos eucariotas: algas, protozoos y hongos.

En resumen: las diferencias más obvias entre ambos tipos celulares radican en la presencia y rol de las membranas. Estas rodean al núcleo en las células eucariotas y también a sus organelos. La división del interior de una

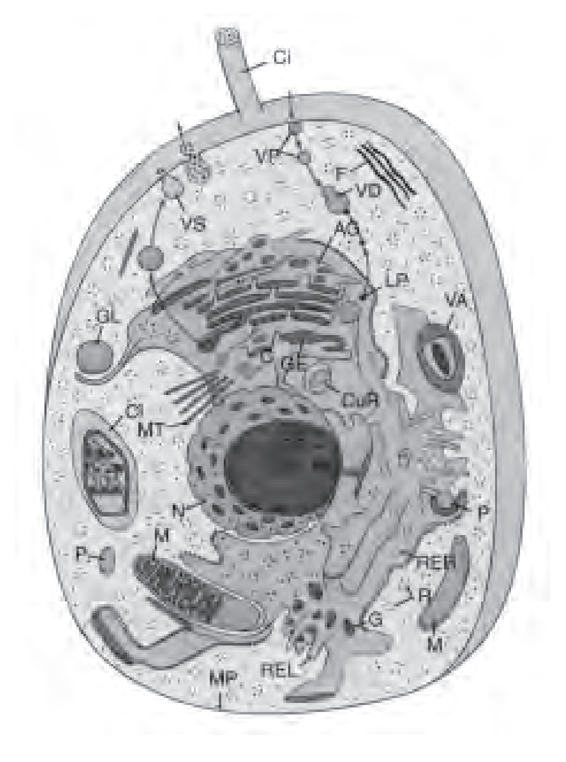


Figura 13- Ultraestructura de una célula eucariota
VA vacuola autofágica, C centriolo, C cloroplasto, Ci cilias, CR cromatina, VD vacuola digestiva, F microfilamentos, G glucógeno, AG aparato de Golgi, GL gotas de lípidos, M mitocondrias, MT microtúbulos, N núcleo, UN nucleolo, P peroxisoma, LP lisosoma primario, MP membrana pasmática, VP vesícula pinocitósica, R ribosomas y polisomas, CuR cuerpo residual, RER retículo endoplasmático rugoso, REL retículo liso, VS vacuola de secreción (Prescott *et al.*, 1999).

célula eucariota por sistemas membranosos permite el desarrollo de funciones bioquímicas y fisiológicas diferentes en compartimentos separados, de modo que puedan ocurrir simultáneamente y con mayor facilidad, en forma coordinada y con regulación adecuada.

Los procesos bioenergéticos y fotosintéticos pueden realizarse más eficientemente ya que se localizan exclusivamente en membranas. También se facilita el transporte de nutrientes a través de la célula. El cuadro 7 describe a los principales organelos de las células eucariotas y sus funciones.

Citoplasma y filamentos citoplasmáticos

La matriz citoplasmática es una de las partes más importantes y complejas de la célula ya que constituye el lugar

Cuadro 7- Funciones de los organelos eucariotas

Membrana citoplasmática adhesión a superficies, secreción.	Barrera semipermeable con sistema de transporte, soporte mecánico de la célula,
Citoplasma	Matriz donde se ubican los organelos y se realizan procesos metabólicos
Microfilamentos, microtúbulos	Estructura y movimientos celulares, forman el citoesqueleto
Retículo endosplasmático	Transporte de materiales, síntesis de proteínas y lípidos
Ribosomas	Síntesis proteica
Aparato de Golgi	Secreción de materiales diversos, lisosomas
Mitocondrias	Producción de energía, ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC), transporte de electrones, fosforilación oxidativa y otras vías
Cloroplastos	Fotosíntesis
Núcleo	Alberga la información genética, control celular
Nucleolo	Síntesis de ARN robosomal, formación de los ribosomas
Pared celular y película	Forma y estructura a la célula
Cilias y flagelos	Movimiento celular

donde se realizan muchos procesos bioquímicos. Está formada por un 70 a 85% de agua, que se encuentra como agua en estado libre, osmóticamente activa, o ligada, como agua de hidratación de proteínas y otras macromoléculas. El pH es cercano a la neutralidad, pero puede variar ampliamente (las vacuolas de los protozoos pueden tener pH de 3 a 4).

Los microfilamentos constituyen filamentos de proteínas con diámetro entre 4 a 7 nm, pueden estar distribuidos por la matriz del citoplasma u organizados en redes y participan en el movimiento y cambios de formas de las células (movimiento ameboide, de los gránulos y corrientes citoplasmáticas). La proteína constitutiva es una actina, similar a la proteína contráctil del tejido muscular.

Los microtúbulos, tienen forma de cilindros finos de 25 nm de diámetro formados por dos subunidades proteicas esféricas que forman un cilindro con varias subunidades en cada vuelta. Estos ayudan a mantener la forma celular, participan con los microfilamentos en el movimiento celular y actúan en procesos de transporte a través de la célula.

Los microtúbulos están también presentes en estructuras que participan en movimientos celulares: huso mitótico, cilias y flagelos. Ciertas sustancias como la colchicina alteran la estructura de los microtúbulos y bloquean la mitosis y el movimiento de la célula.

Las células procariotas carecen de este **citoesqueleto** organizado y no presentan proteínas similares a la actina.

Retículo endoplasmático (RE) y aparato de Golgi (AG)

RE: Además del citoesqueleto, el citoplasma está ocupado por una red de túbulos membranosos ramificados y fusionados de 40 a 70 nm de diámetro y sacos aplanados que constituyen el RE. Cuando existe activa síntesis de proteínas para excretar, el RE aparece cubierto de ribosomas (retículo granular o rugoso). Las células que sintetizan gran cantidad de lípidos presentan una RE liso o agrunular.

Funciones: transporte de proteínas, lípidos y otros materiales a través de la célula y es también un importante lugar de síntesis de membrana celular.

AG: es un organelo membranoso compuesto de 4 a 8 sacos membranosos aplanados o cisternas, llamado dictiosoma y no presentan ribosomas. En los extremos de las cisternas se ubica una red compleja de túbulos y vesículas (diámetro de 20 a 100nm). Parece que los materia-

les se transportan de las cisternas en formación hacia las más maduras por vesículas que se desprenden por gemación y se desplazan al saco siguiente.

El aparato de Golgi está presente en la mayoría de las células eucariotas, pero muchos hongos y protozoos ciliados pueden carecer de una estructura visible. Este aparato prepara a los materiales para su secreción, variando la naturaleza exacta de su rol según el organismo. Participa a menudo en el desarrollo de membranas celulares y en la secreción de sustancias. En todos los casos los materiales se desplazan del RE al AG. Las vesículas se desprenden del RE por gemación y se fusionan con las cisternas del Golgi recién formadas (cis) (glucoproteínas con hidratos de carbono de cadena corta).

Una función muy importante del AG y el RE es la síntesis de otro organelo, el **lisosoma,** presente en numerosos microorganismos y en plantas y animales. Son cuerpos esféricos cubiertos por membrana, su tamaño varía desde 50 nm hasta varias micras. Participan en la digestión intracelular y contienen las enzimas necesarias para la degradación de macromoléculas (hidrolasas, que funcionan mejor a pH bajo).

Estos organelos son muy importantes en los organismos que se nutren por **endocitosis**: fagocitosis si se engloban partículas de gran tamaño e incluso otros microorganismos para formar una vacuola fagocítica o fagosoma. En la pinocitosis, se atrapan pequeñas cantidades de líquido circundante con solutos y se forman vesículas pinocítcas o pinosomas.

El material de estos denominados **endosomas** es digerido con ayuda de lisosomas formando las vacuolas alimenticias. Los nutrientes digeridos pasan al citoplasma. Los lisosomas realizan estas funciones sin liberar sus enzimas digestivas al citoplasma, que destruiría a la célula.
Todo este complejo sistema de organelos membranosos están coordinados para regular la entrada y salida de materiales de la célula.

Ribosomas

Es de tamaño superior al procariota (70S) y es un dímero formado por subunidades de 60S y 40S, con un diámetro de aproximadamente de 22nm, coeficiente de sedimentación de 80S y PM de 4.10^6. Cuando está unido al RE rugoso lo hace por la subunidad 60S. Su rol es la síntesis proteica, las que penetran en el RE para su transporte, pueden ser secretadas (al núcleo, mitocondria, cloroplasto) o permanecer integradas a la membrana.

Mitocondrias

En estos importantes organelos (figura 14) tiene lugar la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la generación de ATP por transporte de electrones a nivel del sustrato y por fosforilación oxidativa. Al microscopio electrónico se ven como estructuras cilíndricas de 0,3 a 1,0 por 5 a 10 µm (tamaño similar a las células bacterianas). Pueden presentarse mucha cantidad o una sola muy grande por célula.

Presentan doble membrana, la interna presenta invaginaciones conocidas como crestas, que aumentan mucho la superficie. Las crestas pueden aparecer en forma laminar, de disco o de túbulo. La membrana interna engloba a la matriz mitocondrial, densa que contiene a los ribosomas, ADN y a menudo gránulos de fosfato de calcio.

Los ribososmas mitocondriales son más pequeños que los citoplasmáticos y se parecen a los bacterianos por el tamaño, las subunidades y el ADN circular. Las enzimas responsables de la generación de energía se ubican solamente en la membrana interna, donde muchas pequeñas esferas (partículas F1) están adheridas por un pedúnculo a la superficie interna y sintetizan ATP en la respiración.

Las enzimas del ciclo ATC y las de la ß oxidación de los ácidos grasos, se localizan en la matriz.

Las mitocondrias así como los cloroplastos se reproducen por fisión binaria y como se parecen a las bacterias, apoyan la hipótesis de la simbiosis de células procariotas para formar una eucariota.

Cloroplastos

La clase más importante de **plastidios** (organelos para la síntesis y almacenamiento de reservas nutritivas) son los cloroplastos, que presentan clorofila y son el lugar donde se realiza la fotosíntesis (figura 14). Varían en forma y tamaño, pero en general son ovalados (2-4 por 5-10 micras), aunque algunas algas poseen un único cloroplasto gigante que llena casi toda la célula. Son organelos de doble membrana con una matriz llamada **estroma**, den-

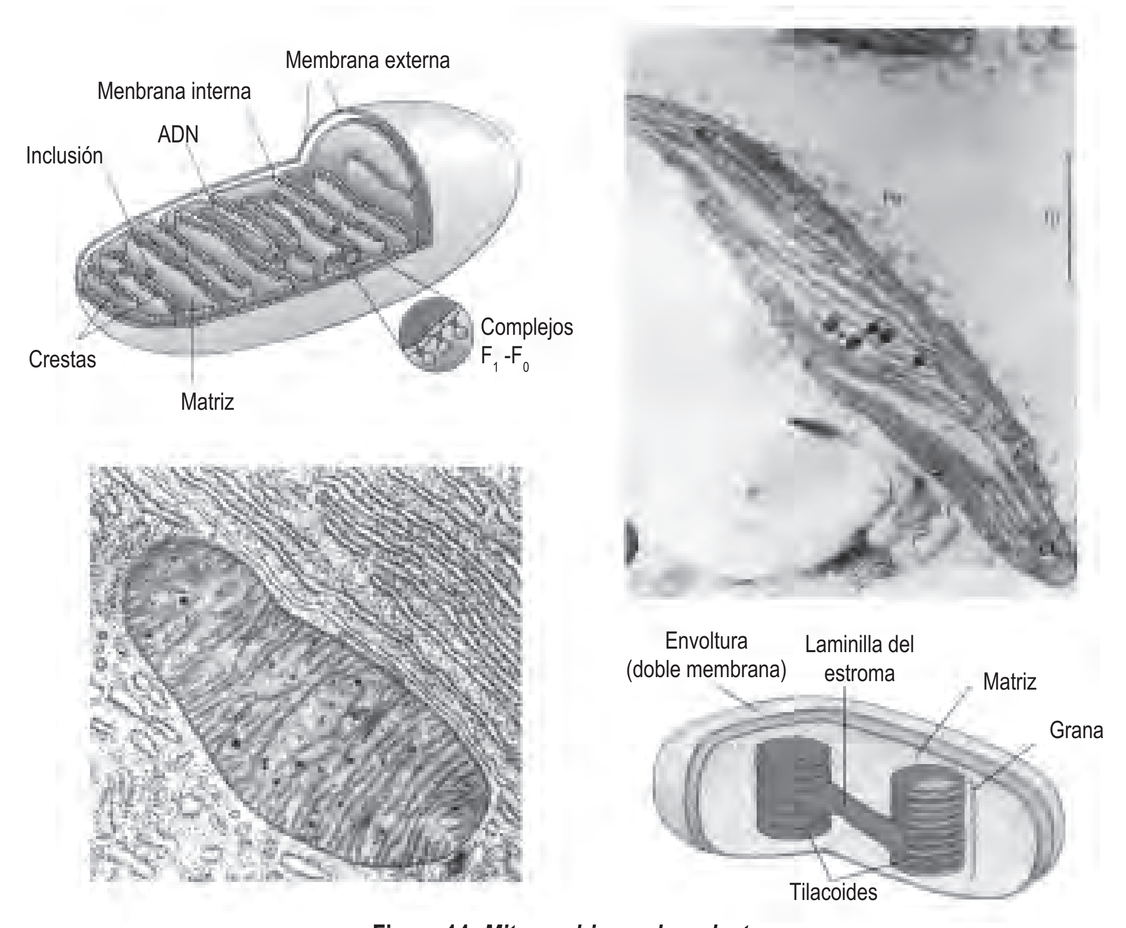


Figura 14- *Mitocondrias y cloroplastos*

Izquierda: **Mitocondria.** Arriba: Esquema de una mitocondria; abajo: micrografía electrónica de transmisión (x 85.000) donde se observan las membranas externas e internas de las crestas y las inclusiones de la matriz. Alrededor se aprecia el RE rugoso.

Derecha: **Cloroplasto**. Arriba: cloroplastos de una *Euglena*, rodeado por membrana doble y los tilacoides están dispuestos en grupos de tres o más. Se aprecian gotitas de lípidos (L), gránulo de paramilo (P) y franjas de la película (Pe) (Prescott *et al.*, 1999).

tro de la membrana interna con ADN, ribosomas gotas de lípidos, gránulos de almidón. La membrana interna se repliega formando unos sacos aplanados llamados **tilacoides.** En muchas algas grupos de tilacoides en forma de disco se apilan como monedas para formar los **grana**.

La fase oscura de la fotosíntesis (reducción del CO_2) ocurre en el estroma y la captación de energía lumínica para generar ATP, NADPH y O_2 (fase luminosa), se localiza en las membranas de los tilacoides, donde se encuentra la clorofila y el sistema transportador de electrones.

Núcleo

Es el organelo más visible de las células eucariotas y fue descripto desde 1831, almacena la información genética y es el centro de control celular. Están limitados por membranas, la externa y la interna de 5-7 micras (membrana unitaria). La envoltura continúa en algunos puntos con el RE y la membrana externa está recubierta de ribosomas. La cromatina es la zona que contiene el ADN, que si bien se encuentra dispersa, se condensa durante la mitosis, formando los cromosomas. Numerosos poros (diámetro aproximado de 70 micras) penetran la envoltura y se forman por la fusión de ambas membranas. Los poros son una ruta de transporte entre el núcleo y el citoplasma.

El nucleolo es un organelo complejo que no está rodeado de membranas, se observa en células en reposo pero desaparece en la mitosis. Desempeña importante papel en la síntesis de ribosomas. El ADN del organizador nu-

clear (parte de un cromosoma específico) dirige la producción de ARN ribosomal (rARN) que se combina con proteínas ribosomales de la matriz citoplasmática, para formar las subunidades ribosomales parcialmente acabadas, las que dejan el núcleo a través de los poros de la envoltura y maduran en el citoplasma.

La división celular de una célula eucariota se realiza asexualmente mediante el proceso de mitosis (división nuclear y transmisión cromosómica) o mediante la fusión de núcleos y reducción cromática (ciclo sexual). El proceso de división celular ocupa solo una pequeña parte de la vida de un organismo (ciclo celular). El crecimiento celular ocurre en la interfase, parte del ciclo celular entre dos mitosis.

Las células diploides pueden permanecer como tales durante su vida o en algún momento pueden reducir el número de cromosomas a la mitad (células haploides), las que pueden actuar como gametos y fusionarse para volver a formar organismos diploides, mediante el proceso de meiosis (figura 15)(Prescott *et al*., 1999).



Figura 15- Esquema de una ciclo celular en eucariotas

Estructuras externas

Las células eucariotas presentan numerosas capas protectoras o de soporte externas a la membrana citoplasmática. Muchos microorganismos carecen de pared celular, como las amebas. La mayoría de las membranas eucariotas contienen esteroles, como el colesterol que le confieren resistencia mecánica.

La pared celular rígida de células eucariotas es más sencilla en composición química que la procariota (peptidoglicano, ácidos teicoicos, lipoproteinas), presenta en general un polisacárido sencillo con un solo monómero, como la celulosa, pectina. Otras contienen sustancias inorgánicas como la sílice (diatomeas) o carbonato de calcio (algunas algas). Los hongos presentan celulosa, quitina o glucano.

Cilias y flagelos

Estos apéndices citoplasmáticos son organelos relacionados con la movilidad celular en eucariotas y se diferencian entre si por su longitud: las cilias miden entre 5 y 20 micras de longitud, mientras que los flagelos pueden alcanzar 100 a 200 micras.

Otra diferencia la constituye la forma de moverse: los flagelos presentan movimiento ondulante, si la onda se mueve desde la base a la punta, la célula es empujada hacia delante, mientras que las cilias lo hacen con una vibración con dos fases distintivas: en el golpe efectivo la cilia actúa como un remo, por lo que impulsa al organismo hacia delante (figura 16). A continuación la cilia se pliega a lo largo, mientras es arrastrado hacia delante en el golpe de recuperación, para preparar otro golpe efectivo. El organismo ciliado coordina los golpes de modo que algunas cilias están en fase de recuperación mientras que otras están en fase efectiva. De este modo se coordina el movimiento en el agua.

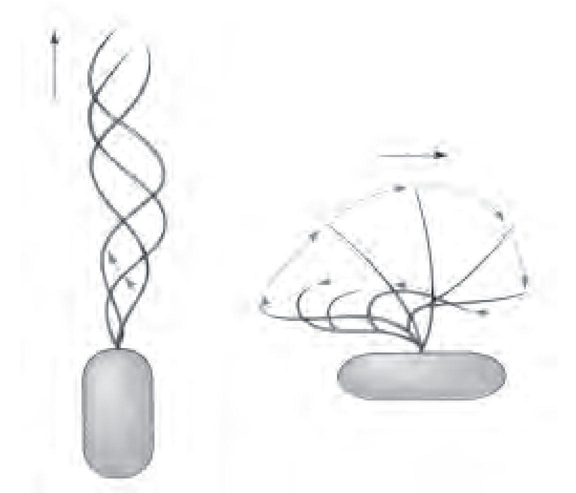
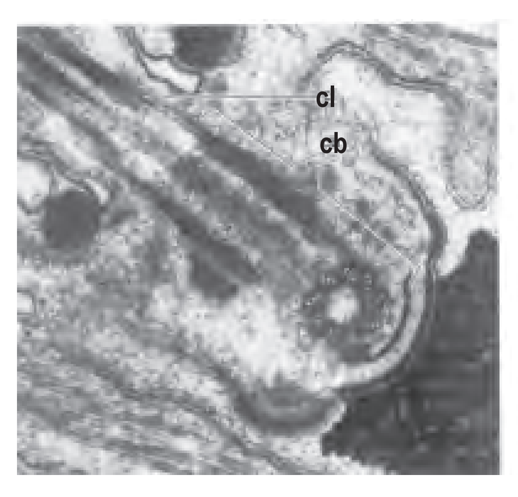


Figura 16- Modelos de movimiento flagelar y ciliar.
El de los flagelos (izquierda) produce ondas que se desplazan desde la base a la punta o en sentido contrario y el organismo se impulsa. El de las cilias presenta dos fases (derecha): golpe efectivo y golpe de recuperación. Las flechas indican el movimiento del agua.



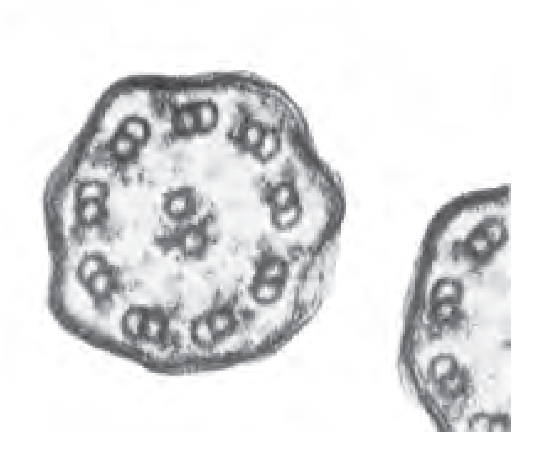


Figura 17- Ultraestructura de las cilias. Izquierda: cuerpo basal (cb) y la cilia (cl) con los microtúbulos centrales y periféricos (x100.000). Derecha: corte transversal de cilias con los dos microtúbulos centrales rodeados por nueve pares de microtúbulos (x160.000) (Prescott *et al*., 1999).

Por el contrario, la ultraestructura de cilios y flagelos es muy similar: son cilindros rodeados de una membrana de unas 0,2 micras. En la matriz se encuentran 9 pares de microtúbulos dispuestos en círculo alrededor de dos microtúbulos centrales (modelo 9+2) (figura 17).

El cuerpo basal se ubica en el citoplasma, en la base de cada cilia y flagelo (figura 17), se trata de un cilindro corto con nueve pares de microtúbulos alrededor de su periferia (modelo 9+0), separado por una placa basal. El movimiento requiere ATP y la proteína dineína lo hidroliza. Estos organelos vibran a ritmo de 10 a 40 golpes u ondas por segundo, impulsando rápidamente a los microorganismos.

Resumen: el cuadro 8 resume las principales características de ambos tipos de células, la procariota y la eucariota Las bacterias y las arquerobacterias son procariotas, el resto de los organismos (algas, hongos, protozoos, plantas y animales) son eucariotas. Las células procariotas son en general más pequeñas, del orden del tamaño de las mitocondrias y cloroplastos eucariotas.

La presencia del núcleo eucariota es la diferencia más obvia entre ambos tipos celulares. El cuadro 8 muestra que las células procariotas presentan una estructura mucho más sencilla.

* Carecen de organelos rodeados por membrana
* No presentan mitosis ni meiosis y su organización genética es más simple (capítulo 5)
* No realizan fagocitosis ni pinocitosis, digestión intracelular, no presentan corrientes citoplasmáticas dirigidas ni movimiento ameboide
* No puede albergar endosimbiontes
* Su nutrición se debe a procesos de ósmosis, hechos explicables por la pared rígida que envuelve a la célula.

Sin embargo, desde el punto de vista metabólico y bioquímico, las semejanzas son marcadas. Los constituyentes químicos son similares, con pocas excepciones el código genético es el mismo así como los metabolismos básicos de síntesis de macromoléculas y de generación de energía.

Los virus

Se aplica el término **virus** a entidades biológicas submicroscópicas muy simples, desprovistas de actividad metabólica e incapaces de reproducirse fuera del organismo que parasitan. Alternan su ciclo de vida en dos fases: la extracelular, donde se comportan como partícula inerte, aunque infecciosa, el virión; y la intracelular, en la cual el virus se presenta como ácido nucleico replicable y la célula del huésped (animal, vegetal o microbiana) gobernada por este ácido nucleico, réplica todos los componentes virales, provocando la infección daños celulares e incluso la lisis de las mismas.

Cuadro 8- Comparación entre células procariotas y eucariotas

Organización genética	Eucariota	Procariota
Nucleoplasma con membrana	si	no
Nº de cromosomas	varios	1 (?)
Nucleolos	si	no
Cromosomas con histonas	si	no
División mitótica	si	no
ADN en organelos	si	no
Recombinación por:		
i) fusión de gametos	si	no
ii) diploides parciales	no	si
Estructura citoplasmática		
Retículo endoplasmático	si	no
Aparato de Golgi	si	no
Lisosomas	si	no
Mitocondrias	si	no
Ribosomas	80S (70S en organelos)	70S
Microtúbulos	si	no
Organelos con membrana no unitaria	no	si
Pared con peptidoglicano	No	si

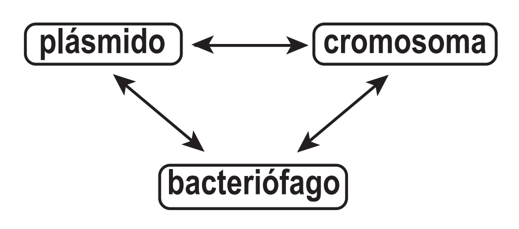
En algunas bacterias el ADN se integra al genoma y se replica ordenadamente con la célula (lisogenia).

Los constituyentes esenciales de un virus son: un solo ácido nucleíco ADN o ARN de cadena simple o doble y una envoltura protectora o cápside de arquitectura helicoidal o polihédrica, formada de subunidades proteicas (figura 19). Algunos virus poseen envolturas adicionales con lípidos y polisacáridos. Las proteínas poseen carácter antigénico y permiten su reconocimiento.

El ADN de varios virus bacterianos, llamados **bacteriófagos,** es circular, como los plásmidos y el cromosoma bacteriano, elementos genéticos muy relacionados a los virus.

Los **bacteriófagos,** también llamados fagos, se caracterizan por:

Contener pequeñas moléculas de ADN o ARN y una cubierta o cápside proteica que lo protege en el ambiente.



Algunos pueden presentar otra envoltura más externa, de carácter lipídica.

En la célula huésped penetra sólo el ácido nucleico.
Son entidades biológicas autoreplicativas: se multiplican dentro de las bacterias (ciclo lítico).

Los fagos virulentos sólo se propagan por el ciclo lítico y los temperados pueden propagarse por ciclos líticos o lisogénicos.

Ciclo lítico de infección

Se distinguen varias fases:

- **de adsorción**: el ciclo lítico comienza cuando una partícula fágica tiene posibilidad de colisionar con una célula huésped; si el virión posee un sitio de adsorción químicamente complementario de un sitio receptor de la superficie celular, ocurre una adsorción irreversible. Estos receptores se encuentran en bacterias G^- en la capa externa lipoproteica de la pared o bien a nivel de la capa lipopolisacárida. Para algunos fagos el receptor se encuentra en los apéndices, flagelos o *pili*.

- **la fijación y penetración:** se realiza por las fibras de la cola y una enzima (la lisozima) comienza a actuar, rompiendo los enlaces glucosídicos del peptidoglicano. Luego el bacteriófago inyecta su ADN en la célula mediante una contracción de las fibras de la cola, quedando afuera el resto del virión (cabeza y cola).

  Se comprobó radioquímicamente que sólo el ADN penetra en la célula, marcándolo con P^{32} (la radioactividad del ADN viral queda en las bacterias); las proteínas, marcadas con S^{34}, se detectaron fuera de las células (figura 20) (Madigan *et al*., 2000).

- **fase de eclipse** con dos etapas:
  * formación de proteínas tempranas: el virus dentro de la célula deja de existir como entidad independiente, se dice que entra en fase vegetativa y se habla de fago vegetativo. Parte del ADN viral es transcripto por ARN polimerasa del huésped para formar ARN mensajero viral. Los ribosomas del huésped traducen este mARN y forman nuevas enzimas (las tempranas), incluyendo las necesarias para la replicación del ADN viral y una nueva ADN polimerasa y desoxirribonucleasa que destruye el ADN del huésped.
  * replicación del ADN del fago: la de una molécula de ADN circular puede ocurrir de dos maneras: en el modelo simétrico, las dos cadenas tienen igual papel, mientras que en el modelo asimétrico, una cadena no se rompe y la otra se hace lineal. En fagos con ADN monocatenario, éste es rápidamente convertido en doble hélice por una ADN polimerasa bacteriana.

Las moléculas de ADN pueden sufrir mutaciones con ruptura y unión de pares de bases; si la bacteria estuviera infectada por dos fagos diferentes pero genética-

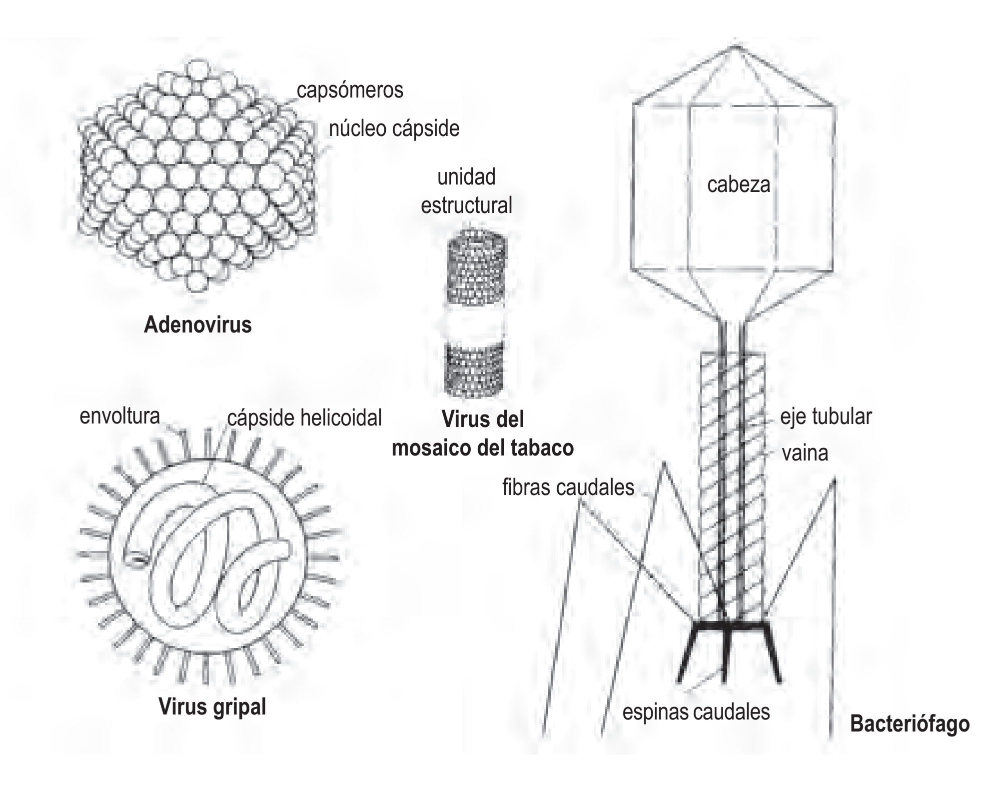


Figura 19- Estructura de algunos virus

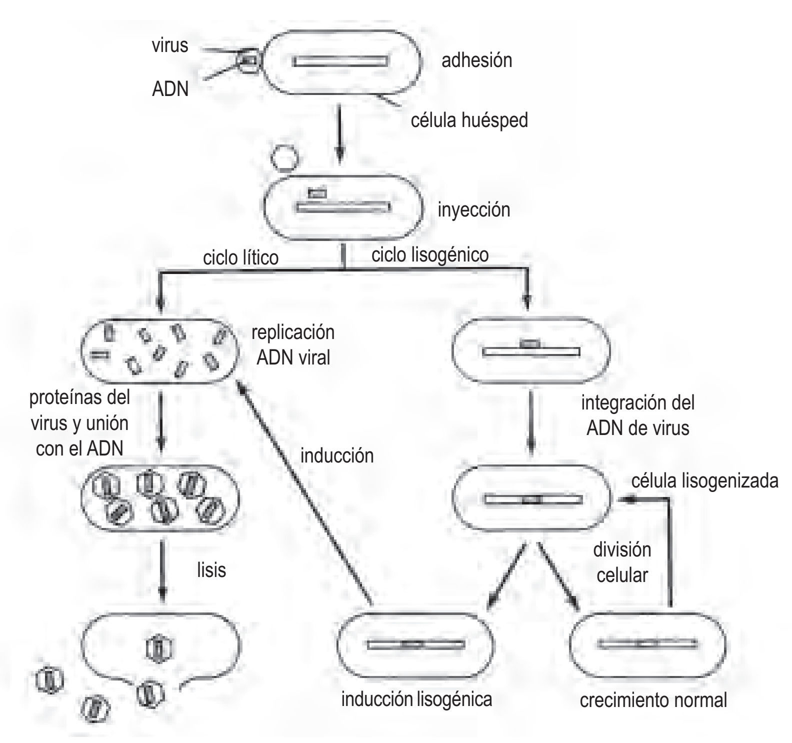


Figura 20- Ciclos líticos y lisogénico de un bacteriófago

mente relacionados, se pueden producir moléculas recombinantes de ADN fágico.

- **maduración,** luego que la replicación del ADN del fago comienza, la parte no transcripta es usada para gobernar la síntesis del mARN viral "tardío" con la consiguiente formación de un segundo grupo de proteínas, entre ellas las subunidades de la cápside. Simultáneamente, las moléculas del ADN viral sufren condensación tomando forma polihédrica.

- **liberación de viriones maduros**: al final del período latente de infección lítica, otra proteína viral "tardía" aparece en la célula: la **lisozima** que ataca al peptidoglicano de la pared celular, la que va siendo debilitada hasta su ruptura por la presión osmótica interna. La progenie fágica se libera al ambiente con los otros constituyentes celulares. La figura 25 muestra los ciclos líticos y lisogénicos

Seguimiento del ciclo lítico de un fago

La figura 21 esquematiza el procedimiento a seguir para evidenciar la presencia de partículas de bacteriófagos y también para realizar su recuento (partículas virales/mL). Si bien pueden observarse en el microscopio electrónico, ésta resulta una tarea larga y tediosa. En general se cuantifican midiendo sus efectos sobre las células bacterianas que atacan. Se habla de **unidades infecciosas virales:** la mínima cantidad que causa efecto detectable sobre un huésped sensible.

Recuento en caja: se siembran juntas diluciones del virus con un cultivo bacteriano sensible al mismo en medio sólido adecuado para el huésped. Se observan las llamadas **playas o placas de lisis**: zona de inhibición del crecimiento bacteriano causado por la liberación sucesiva de ciclos virales líticos (anticolonias).

Los resultados se expresan como **unidades formadoras de playas/mL**. El agregado de un filtrado bacteriólogico (0,45 μm) de suelo, aguas, cultivos microbianos a un medio de cultivo líquido de una especie bacteriana sensible, provocará desaparición de la turbidez (los restos de las células lisadas se acumulan en el fondo del tubo).

Este método permite también el aislamiento de partículas víricas, ya que se supone que cada playa deriva de una



Figura 21- Seguimiento de un ciclo lítico de un bacteriófago

sola partícula fágica, todos los derivados de él serían genéticamente idénticos. Los eventos ilustran una curva de crecimiento de un solo paso. Se repica la playa de lisis en medio de cultivo bacteriano fresco.

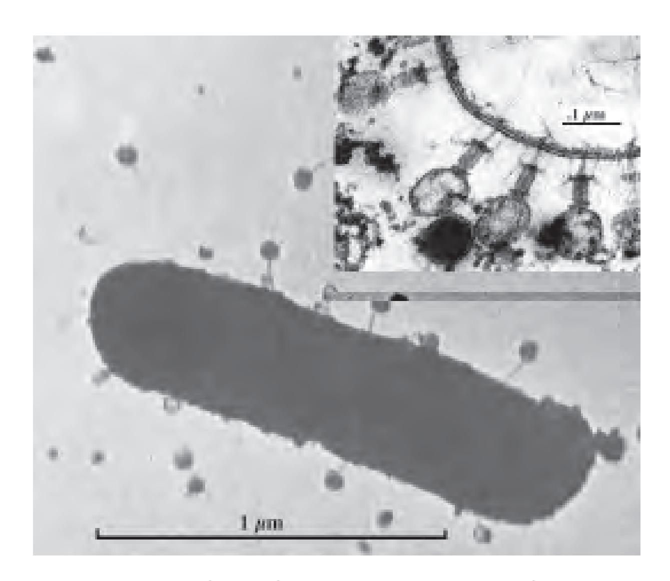


Figura 22- Microfotografía electrónica de *E. coli* infectada por el fago T_4. Se observan las placas basales y los tubos proteicos de la cola

Los virus que atacan animales se repican en frascos con una monocapa de células animales. Las placas se revelan por las zonas de destrucción de esas células.

Clasificación de los fagos: no se han desarrollado relaciones filogenéticas y se aplican propiedades como el rango de los huéspedes y relaciones inmunológicas, pero las más útiles son la morfología, naturaleza del ácido nucleico y de la cápside. Los virus que atacan bacterias presentan en general ADN, habitualmente de doble cadena, presentan estructura icosaédrica (20 caras en la proteína de la cápsula), sin cola, o virus con colas contráctiles, fagos filamentosos. Hay incluso algunos con una envoltura lipídica más externa. Los más conocidos y de estructura más compleja son los fagos con colas contráctiles, como los fagos conocidos como los de la serie T de *E. coli* (figura 22).

Lisogenia

Muchos bacteriófagos a pesar de poder lisar a las células del huésped, ejercen efectos menos drásticos. Son los llamados **virus temperados** que pueden entrar en un estado llamado **lisogenia**, donde la mayoría de los genes virales no se expresan. En gran parte de las células de la progenie no se forman proteínas virales, muchos de los genes virales se han reprimido y su genoma es replicado sincrónicamente con el genoma del huésped, duplicándose en la división celular, pasando de una generación a otra por largos períodos de tiempo. Las células parecen perfectamente normales.

Pero esta bacteria, en ciertas condiciones puede espontáneamente o por agentes mutagénicos, como radiaciones UV, producir viriones del virus temperado y lisar a la célula portadora. La célula se lisa y libera los viriones maduros. Esta relación virus-huésped se conoce como **lisogenia** y

las células que poseen la capacidad latente de producir partículas maduras de fago, se llaman lisogénicas.

Los fagos que realizan esta interacción se dicen temperados y el genoma viral en una célula lisogénica se denomina **profago**. Parece que los bacteriófagos encuentran ventajas al lisogenizar células, cuando existe privación de nutrientes antes de que las bacterias entren en inactividad degradan sus propios mARN y sus proteínas. Esta situación complicada puede evitarse si el fago se vuelve inactivo (lisogénico), al mismo tiempo que su huésped. Cuando existe infección por multiplicidad de fagos y todas las células están infectadas, el último ciclo de multiplicación celular destruye todas las células del huésped. Existe el riesgo de que los virus se queden sin el huésped y se encuentren expuestos a factores nocivos del ambiente.

La mayoría de los fagos temperados existen como profagos integrados en la bacteria lisogénica. Pero algunos, como el fago P_1 de *E. coli* se circulariza luego de la infección y comienza a fabricar el represor que impide la actividad de la ARN polimerasa y la síntesis de proteínas, se mantiene como molécula independiente y se replica al mismo tiempo que el cromosoma del huésped.

Cuando *E. coli* se divide, el ADN del fago se reparte en las células hijas, de modo que todas las células lisogenizadas contienen una o dos copias del genoma fágico.

La lisogenia es un importante mecanismo de transferencia de material genético en procariotes, ya que alguno de los virus puede encapsular trozos del ADN de la célula infectada (defectuoso) y transferirlo a una célula receptora por mecanismo conocido como **transducción** (capítulo 5).

Bibliografía

Madigan, Martinko y Parker, **Brock, Biología de los microorganismos**, 9ª edición, 2000, Prentice Hall International

Prescot, Harley, Klein, **Microbiología,** 1999 McGraw-Hill.Interamericana

Schlegel, H. G. y B. Bowien **Autotrophic bacteria.** 1989 Science Tech. Publ, Madison, Wis

Stanier, R.Y., J.L. Ingraham, M.L. Wheelis, P.R. Painter **The microbial world.** 5ta edición, 1986 Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. J.

Preguntas de repaso

1) Describa la estructura y la función de una célula bacteriana, indicando cuales de ellas están presentes en todas las bacterias y cuales solamente en algunas especies.
2) Cómo puede obtener nutrientes solubles desde el ambiente? Y las partículas de gran tamaño?
3) Compare la estructura y la composición química de paredes de bacterias Gram positivas y negativas
4) Describa el material genético presente en una célula procariota
5) Polímeros acumulados fuera de la célula: composición y función. Usos que hace el hombre de ellos. Polímeros de reserva internos.
6) Apéndices celulares: comparación con los presentados en eucariotas. Función de ellos
7) Qué propiedades adquieren las células esporuladas? Por qué la esporulación se considera una especie de ciclo celular?
8) Por qué una bacteria no puede mantener endosimbiontes?
9) Formas de división celular de un procariota.
10) Cómo se explica que las bacterias colonicen ambientes tan extremos (aguas termales, materiales en fermentación, glaciares?
11) Señale dos momentos en la evolución de la ciencia que contribuyeron marcadamente al conocimiento del mundo microbiano.
12) Señale tres diferencias fundamentales entre ambos tipos celulares y sus consecuencias en su funcionamiento.
13) Cómo pondría en evidencia la presencia de bacteriófagos para bacterias entéricas (*E.coli, Salmonella*) en muestras de aguas?

3 Nutrición y metabolismo bioenergético en microorganismos

Nutrición microbiana

Los microorganismos requieren **nutrientes**, sustancias químicas que estimulan el crecimiento microbiano y que son empleadas en la síntesis de sus materiales celulares y que también brindan energía, a los efectos de realizar sus procesos metabólicos, dividirse, moverse, esporular. La síntesis de sus macromoléculas, así como la obtención de energía en los microorganismos quimiosintéticos, deben ser realizadas a partir de los nutrientes.

Las características que debe presentar un nutriente incluyen:
i) atravesar las barreras de la célula (membranas)
ii) ser utilizado por alguna enzima celular
iii) brindarle a la misma sub-unidades de sus macromoléculas y/o energía.

Cuadro 1- Nutrientes microbianos

1- Fuentes de energía
(luz ⟶ fototrofos)
(reacciones químicas ⟶ quimiotrofos)

2. Macronutrientes

C		K
H		Mg
O	95%	Na
N		Ca
S		Fe
P		

2. Micronutrientes (elementos traza)
Co, Zn, Mo, Cu, Mn, Ni, Se, B, etc.

3- Factores de crecimiento
vitaminas ⟶ coenzimas
purinas y pirimidinas ⟶ ADN, ARN
aminoácidos esenciales ⟶ síntesis proteica

Los elementos como nutrientes

La célula microbiana está constituida por agua en su mayor parte y de la fracción materia seca se distinguen los macroelementos: C, O, H, N, S, P, K, Ca, Mg, Fe, que la célula toma en cantidades relativamente grandes (g/L en el medio de cultivo), mientras que los llamados micronutrientes se requieren en niveles muy bajos, del orden de los mg/L.

El cuadro 1 presenta los distintos tipos de nutrientes requeridos para el desarrollo microbiano.

Los 6 primeros macronutrientes integran importantes moléculas (hidratos de carbono, lípidos, proteínas, ácidos nucleícos), los restantes se encuentran en forma de cationes y pueden actuar como coenzimas de muchas enzimas (K^+). El Ca contribuye a la termoresistencia de las endosporas. El Mg forma complejos con el ATP y el Fe forma parte de citocromos, es cofactor de enzimas y de proteínas transportadoras de electrones.

El cuadro 2 resume los ingredientes fundamentales para el desarrollo de los organismos vivos y las formas químicas en que los microorganismos pueden tomarlos en la naturaleza y en los medios de cultivo. El cuadro 3 presenta la composición media de una célula bacteriana.

Los microorganismos también requieren oligoelementos o **micronutrientes**, empleados en los medios en menor concentración (mg/L), como el Mn, Zn, Co, Mo, Ni, Cu, etc.). A veces los contaminantes del agua, recipientes del laboratorio, alcanzan a satisfacer las necesidades en es

Cuadro 2- Macronutrientes en la naturaleza y en los medios de cultivo

Elemento	**Forma habitual en el ambiente**	**Forma química usada en los medios de cultivo**
Carbono (C)	CO_2, compuestos orgánicos	Glucosa, malato, acetato, piruvato, muchos compuestos o mezclas de compuestos (extracto de levadura, peptonas, celulosa, petróleo,etc)
Hidrógeno (H)	H_2O, compuestos orgánicos	H_2O, compuestos orgánicos
Oxígeno (O)	H_2O, compuestos orgánicos	H_2O, compuestos orgánicos
Nitrógeno (N)	NH_3, NO_3^-, N_2, compuestos orgánicos con N, peptonas, etc.	Inorgánicos: sales amoniacales, nítricas, N_2 Orgánicas: aminoácidos, bases nitrogenadas de nucleótidos, numerosos compuestos orgánicos con N
Fósforo (P)	PO_4^{-3}	KH_2PO_4, Na_2HPO_4
Azufre (S)	H_2S, $SO_4^{=}$, sulfuros metálicos, compuestos orgánicos con S: peptonas	Na_2SO_4, $S_2O_3Na_2$, Na_2S, compuestos orgánicos con S
Potasio (K)	K^+, sales solubles	KCl, KH_2PO_4
Magnesio (Mg)	Mg^{++}, en solución o como sales	$MgCl_2$, $MgSO_4$
Sodio (Na)	Na^+ en solución o como NaCl u otras sales de sodio	NaCl
Calcio (Ca)	Ca^{++} en solución o como $CaSO_4$ u otras sales	$CaCl_2$
Hierro (Fe)	Fe^{++} o Fe^{+++} en solución como FeS, $Fe(OH)_2$ u otras sales de Fe	$FeCl_3$, $FeSO_4$, soluciones de Fe quelatado con EDTA, o citrato, etc.

Cuadro 3- Composición química media de una célula procariota

Molécula	**% peso seco**	**moléculas por célula**	**clases diferentes**
Total de macromoléculas	96	24.610.000	2.500
Proteínas	55	2.350.000	1.850
Polisacáridos	5	4.300	2
Lípidos	9,1	22.000.000	4
ADN	3,4	2,1	1
ARN	20,5	255.500	660
Total de monómeros	3,5		350
Aminoác.y precursores	0,5		100
Azúcares y precursores	2		50
Nucleótidos y precursores	0,5		200
Iones inorgánicos	1		18
total	100%		

tos elementos. Integran normalmente enzimas y cofactores, tienen función catalítica y mantienen estructuras proteicas. Así, el Mo interviene en la fijación del N_2, en la nitrato reductasa, el Co integra la vitamina B_{12}, el Na es requerido por muchas especies marinas.

Requerimientos de carbono: los microorganismos presentan gran versatilidad en el empleo de sustancias carbonadas. Por las fuentes de carbono que emplean se clasifican en:

- autótrofos: fuentes inorgánicas: CO, CO_2
- heterótrofos: fuentes orgánicas muy variadas: azúcares, alcoholes, ácidos grasos, hidrocarburos, polímeros como la celulosa, lignina.

No existe ninguna molécula orgánica de origen natural que no pueda ser empleada por un microorganismo.

Especies de pseudomonas pueden emplear más de 100 compuestos diferentes de C orgánico. Desgraciadamente, sustancias sintetizadas por el hombre como los plásticos, el DDT, muchos herbicidas, se degradan muy lentamente o no lo hacen (sustancias recalcitrantes).

En el otro extremo de la escala, se encuentran bacterias muy selectivas en el empleo de fuentes de carbono: las metanotróficas, emplean el hidrocarburo metano, metanol, CO y algunas otras moléculas con un sólo C orgánico. Otras emplean CO_2 y son los microorganismos productores primarios de materia orgánica.

Requerimientos en N, P, S: los microorganismos pueden emplear estos elementos a partir de las mismas fuentes orgánicas de las que derivan el carbono, aunque usan frecuentemente fuentes inorgánicas, como sales minerales solubles. El N lo usan desde fuentes inorgánicas reducidas como el amonio (NH_4^+), pasando por el N-orgánico (R-NH_2), N_2 (diazotrofos o fijadores de N_2), NO_3^-. La fuente más sencilla de asimilar la constituyen las sales de amonio, ya que el N se encuentra en el mismo estado de oxidorreducción que en los aminoácidos. La célula emplea energía creciente al asimilar nitratos y nitrógeno molecular. El S puede ser nutriente como sulfuros (en general tóxicos para la mayoría de los microorganismos), S-orgánico (puentes sulfuro o disulfuro), Sº, formas inorgánicas de S hasta sulfatos. El Fe es asimilado en estado reducido (Fe^{++}) o en complejos orgánicos (EDTA-Fe).

Los demás nutrientes son muy empleados en general como sales solubles.

Factores de crecimiento: muchos microorganismos, incluso los autótrofos, requieren una o más moléculas orgánicas para su desarrollo, ya que no pueden sintetizarla a partir de los nutrientes. Deben tomarlas completas del medio o bien sus precursores, a muy baja concentración, como los micronutrientes. Ejemplos de ellos son: **vitaminas** (parte o totalidad de cofactores de enzimas), **aminoácidos esenciales** para la síntesis proteíca, **bases púricas y pirimídicas** (para la síntesis de ácidos nucleícos) (cuadro 1).

Muchos microorganismos son empleados para valorar cantidades pequeñas de factores de crecimiento, como la vitamina B_{12}, riboflavina. El microorganismo se desarrolla en forma proporcional a la cantidad de factor de crecimiento agregado al medio de cultivo. Curvas patrones con estándares puros de la vitamina, permite efectuar las comparaciones. Los bioanálisis microbiológicos se emplean muchas veces a pesar de los avances en las determinaciones químicas (Capítulo 20).

Un microorganismo se denomina:

protótrofo cuando emplea los mismos nutrientes que la mayoría de las cepas de su especie que existen en la naturaleza. Pero esta bacteria puede mutar y requerir tomar del medio el nutriente para su desarrollo, se comporta entonces como

auxótrofo para ese nutriente, como un aminoácido, que se convierte en esencial. Estos microorganismos se usan mucho en estudios de genética bacteriana.

En resumen: las potencialidades metabólicas de los microorganismos son muy variadas (cuadro 9), desde aquellos prácticamente autosuficientes (fotolitotrofos), hasta los muy exigentes, que requieren agregados de varios factores de crecimiento, muchas veces contenidos en los extractos de lavadura, de malta, de carne, de suelo, etc.

Entrada de nutrientes a la célula

En general los nutrientes deben ser transportados desde soluciones diluidas (suelo, aguas, alimentos) hacia

la célula en contra de un gradiente de concentración. Los nutrientes deben atravesar la membrana semipermeable por **ósmosis**, por los mecanismos conocidos como: difusión facilitada, transporte activo y por translocación de grupos.

Microorganismos eucariotas sin pared o con orificios en la misma incorporan nutrientes por **endocitosis:** pinocitosis en el caso de sustancias en solución (gotas) o fagocitosis, sustancias particuladas (bacterias).

El sistema más común entre las bacterias es la **difusión pasiva**, proceso por el cual las moléculas se desplazan desde una región de alta concentración a otra de menor concentración. Cuando intervienen proteínas de membrana (permeasas) que se unen al sustrato para facilitar su difusión al interior de la célula se habla de **difusión facilitada**.

El **transporte activo** permite el pasaje de moléculas en contra de un gradiente de concentración, situación muy común en la naturaleza, con aporte de energía en forma de ATP, lo que permite concentrar sustancias con intervención de proteínas transportadoras que se unen a determinados solutos en forma muy específica y forman un poro en la membrana. Sustancias similares pueden competir por la proteína de transporte tanto en la difusión facilitada como en el transporte activo. Las bacterias emplean también la fuerza motriz de protones (generada en el gradiente de protones en el transporte de electrones a nivel de membrana) para dirigir el transporte activo.

Los microorganismos presentan varios sistemas de transporte para una misma sustancia, lo que les brinda gran ventaja competitiva en el ambiente.

La translocación de grupos implica la introducción de una sustancia al interior de la célula luego de modificarla químicamente, el sistema de translocación que mejor se conoce, es el del fosfoenolpiruvato, sistema fosfotransferasa de azúcares. Muchos hidratos de carbono son transportados por este mecanismo.

Importante es el papel que juegan los **sideróforos,** moléculas orgánicas de bajo peso molecular, capaces de formar complejos organo-metálicos con el ion férrico a los efectos de transportarlo al interior de las células, donde una hierro reductasa lo reduce a ión ferroso, asimilable por el microorganismo. El tema es relevante en el control biológico de microorganismos fitopatógenos, quienes compiten por bajos niveles de hierro disponible en los suelos, con los microorganismos antagonistas seleccionados e inoculados en las semillas en viveros, como *Pseudomonas* (capítulo 17).

Clasificación nutricional de los microorganismos

Los microorganismos se clasifican nutricionalmente por la naturaleza de su fuente de energía, por la fuente principal de carbono y por la naturaleza de los donadores de electrones (cuadro 4).

El cuadro 5 presenta los tipos nutricionales más comunes, donde se aprecian organismos que emplean sustancias muy simples, como minerales y CO_2 y aquellos, más exigentes, con requerimientos de compuestos carbonados variados.

Resumiendo veremos ejemplos de algunos grupos:
Fotoautolitotrofos Algas, bacterias fotosintéticas sulfurosas, cianobacterias

Cuadro 4 Clasificación nutricional de los microorganismos

Fuentes de energía (fototrofos ⟶ emplean la luz
(quimiotrofos ⟶ reacciones químicas con sustratos: orgánicos
inorgánicos

Fuente principal de carbono (autótrofos ⟶ CO_2
(heterótrofos ⟶ compuestos inorgánicos

Fuente de donadores de electrones/H^+ (orgánicos ⟶ organotrofos
(molécula que se oxida) (inorgánicos ⟶ litotrofos

Cuadro 5- Ejemplos de tipos nutricionales microbianos

Tipo	Fuente de energía	Fuente de carbono	Donadores de electrones	Ejemplos
Fotoautolitotrofos (FAL)	luz	CO_2	Agua, sulfuros, H_2	Algas, cianobacterias Bacterias fotosintéticas sulfurosas
Fotoautoorganotrofos (FAO)	luz	CO_2	Ácidos orgánicos	Bacterias fotosintéticas no sulfurosas
Fotoheteroorganotrofos (FHO)	luz	Materia orgánica (ácidos)	Materia orgánica (ácidos)	Algunas bacterias fotosintéticas no sulfurosas
Quimioheteroorganotrofos (QHO)	Reacciones químicas	Materia orgánica	Materia orgánica	La mayoría de los microorganismos
Quimioautolitotrofos (QAL)	Reacciones químicas	CO_2	NH_4^+, $S^=$, H_2, etc.	Pocas bacterias típicas y *archeae*

Fotoautoorganotrofos Bacterias fotosintéticas no sulfurosas (emplean sustancias orgánicas simples como donadores de electrones en la fotosíntesis)

Quimioautolititrofos Bacterias oxidantes del amonio, del nitrito, del azufre, del hierro, del hidrógeno (aerobias), desnitrificantes autótrofas (anaerobias). Importantes en los ciclos biogeoquímicos.

Quimioheterotrofas La mayoría de los microorganismos usan materia orgánica como fuente de energía, de carbono y donadores de electrones (la sustancia que se oxida). En general la misma sustancia puede cumplir todas estas funciones. Todos los hongos, protozoos y la mayoría de las bacterias pertenecen a esta categoría.

Medios de cultivo

Un gran desarrollo en la microbiología se ha logrado luego del aislamiento y cultivo de los microorganismos en el laboratorio. Esto se logró a partir de su siembra en los **llamados medios de cultivo**: conjunto de nutrientes que permiten el desarrollo de microorganismos particulares. Todos contienen agua y fuentes de energía, C, N, S, Fe, P, etc., micronutrientes, factores de crecimiento y aditivos como colorantes, antibióticos, sales, etc.

Para el desarrollo microbiano es necesario tener en cuenta además de los nutrientes, las llamadas **condiciones de cultivo:** el pH, presión osmótica, temperatura de incubación, nivel de oxígeno, etc. a niveles adecuados, sin las cuales el microorganismo no se desarrollará o lo hará mal.

Condiciones para el crecimiento microbiano

Se toman en cuenta:

Los medios de cultivo, que aportan los nutrientes, como el agua, fuentes de E, C, N, S, P, etc., los micronutrientes, empleados en baja concentración (Cu, Cd, Zn, etc. y los que actúan como factores de crecimiento (vitaminas, aminoácidos esenciales, bases de ácidos nucleicos).

Las condiciones de cultivo: temperatura, radiaciones, luz, aireación, presión osmótica, que afectan el desarrollo de los microorganismos.

Clasificación de los medios de cultivo

Los medios de cultivo (cuadro 6) pueden ser de origen natural, como jugos vegetales, leche, etc. o artificiales, formulados en el laboratorio. Por su naturaleza física, se usan líquidos para propagar un microorganismo, para el estudio de aspectos metabólicos, etc., sólidos, con sustancias solidificantes, en general orgánica como agar-agar al 2%, o minerales, como el sílico-gel.

Cuadro 6- Clasificación de los medios de cultivo

Por su origen

- naturales (derivados de tejidos, leche, vegetales, sangre, etc.
- artificiales (sintéticos, de composición química conocida
  (complejos, de composición no definida, con: peptonas, extracto de carne, de levadura, de suelo, sangre

Por su naturaleza física

- líquidos (en tubos, matraces, en la industria
- sólidos (solidificantes como agar-agar al 2%, sílico-gel (inorgánico)
- semisólidos (0,2% de agar

Por su uso en el laboratorio

- básicos o fundamentales: permiten el desarrollo de microorganismos heterótrofos corrientes. Ej: agua, sales, $ClNH_4$, glucosa
- mejorados o enriquecidos, ejemplo: caldo simple (extracto de carne (5g), NaCl (5g), peptona (10g), agua 1L, pH 7,2
- diferenciales: colorantes distinguen colonias por cambios de pH, potencial redox. Ejemplo: agar simple con glucosa y azul de bromotimol
- selectivos: permiten el desarrollo de un tipo microbiano. Ejemplo: nitrificantes (agua, sales, $ClNH_4$, pH neutro, oscuridad

Hasta la introducción del agar-agar los medios se solidificaron con una proteína, la gelatina, con el inconveniente de que muchos microorganismos producen proteasas que la hidrolizan, licuando al medio, inicialmente sólido. El agar-agar es un polímero de alto peso molecular, aislado de un alga marina. Funde a los 100ºC y se mantiene en estado líquido hasta aproximadamente 45ºC lo que permite repartirlo en cajas de Petri, antes de su solidificación.

Se usan solidificantes inorgánicos, como el sílico gel, producido por la unión de soluciones de silicato de sodio o de potasio con ácido clorhídrico de densidades adecuadas. Luego de gelificación y repetidos lavados para eliminar el ácido restante, se pasan por agua hirviendo y luego se impregnan con los nutrientes. Es empleado para aislamiento de organismos autótrofos, como los nitrificantes.

Los medios sólidos se usan en tubos o cajas de Petri, para el aislamiento, purificación y numerosos tipos de estudios. Los semisólidos, llevan baja concentración de solidificante, por ejemplo con 0,2% de agar y son empleados para estudios de microorganismos microaerofílicos (cuadro 7). Los medios selectivos son muy útiles para el aislamiento de miroorganismos con exigencias particulares, como los autotrófos (medios sin C-combinado), fijadores de N_2 (medio sin N-combinado), otros medios llevan antibióticos, sales biliares, etc. para evitar el desarrollo de organismos no deseados.

El cuadro 7 muestra medios de complejidad creciente, los medios 2 al 5 llevan los nutrientes del medio 1 más lo señalado en el cuadro. Se aprecia que las capacidades metabólicas de los microorganismos decrecen desde los que se pueden desarrollar en el medio 1 (agua y sales, sin C ni N combinados) hasta el medio 5 (complejo, con extracto de levadura como fuente de N - aminoácidos y factores de crecimiento (vitaminas, aminoácidos, precursores de los ácidos nucleicos).

En resumen los medios pueden ser:

- **no selectivos**, o de amplio espectro que permiten el desarrollo de muchos microorganismos. Como se supone, aislar la mayoría de los organismos es tarea imposible. Se denomina microflora total al conjunto de los heterótrofos capaces de crecer en medio con extracto de suelo y una fuente de carbono y energía, como la glucosa.

Otros medios son más aptos para el desarrollo de los hongos: sales minerales, sacarosa, nitratos, acidificado por ácidos orgánicos y con antibióticos que inhiben la proliferación de bacterias. Los actinomicetes pueden atacar nutrientes más complejos que las bacterias, como caseína, quitina, almidón, ácidos húmicos, etcétera.

- **selectivos**, o de espectro limitado, están formulados para favorecer el desarrollo de un grupo particular de microorganismos a expensas del resto de la población.

Cuadro 7- Medios de cultivo de complejidad creciente

Componentes comunes	componentes adicionales			
Medio 1	**Medio 2**	**Medio 3**	**Medio 4**	**Medio 5**
Agua, 1L				
K_2HPO_4, 1g	NH_4Cl, 1g	NH_4Cl, 1g	NH_4Cl, 1g	
KH_2PO_4, 1g		glucosa	glucosa	glucosa
$MgSO_4.7H_2O$, 20mg			ácido nicotínico 100mg	extracto de levadura, 5g
$FeSO_4.7H_2O$, 10mg				
Micronutrientes: Mn, Mo,Cu,Co,Zn, como sales (0,02-0,5mg/L de c/u)				

Así, la puesta en evidencia de los grupos fisiológicos - conjunto de organismos taxonómicamente a veces no relacionado, pero que presentan la misma aptitud para efectuar reacciones de biodegradación o de biosíntesis, como los celulolíticos, los amonificantes, etc., se realiza por siembra en medios selectivos apropiados.

Siembra y aislamiento

Siembra: es colocar un microorganismo en un medio apropiado para que se desarrolle.

Se realiza con fines variados: aumentar el número de microorganismos en medio sólido o líquido, para obtener biomasa microbiana para uso industrial, preparar inoculantes biológicos, obtener metabolitos de interés. La siembra puede realizarse para obtener cultivos puros, entonces se habla de aislamiento.

Aislamiento: obtención de cultivos puros, en general microorganismos derivados de una sola célula (clon).

El **aislamiento** puede ser:

- **directo:** con ayuda de ansa se siembra la superficie del medio sólido. Cuando la densidad es alta (como es el caso de la mayoría de los heterótrofos) se logran colonias aisladas. La ayuda de **micromanipuladores** permite aislar bajo el microscopio una célula o propágulos claramente visibles como hongos muy pigmentados, pero resulta más difícil en el caso de las bacterias.
- **por enriquecimiento previo**: si la población es baja se inocula la muestra en un medio selectivo líquido y por libre competencia predominarán los grupos capaces de emplear los sustratos. Luego de sucesivos pasajes por medio fresco se logra el aislamiento sembrando en la superficie del mismo medio, pero sólido.

Los medios se hacen selectivos por:

1. **contener un sustrato específico**, como fosfato insoluble, celulosa, sales de amonio como única fuente de nitrógeno y energía, N_2, etc.

2. **cambio del pH**, la acidificación inhibe el desarrollo de la mayoría de los neutrófilos y se posibilita el crecimiento de especies resistentes (*Lactobacillus, Thiobacillus,* etc.).

3. **con sustancias inhibidoras selectivas**: actidiona, antibióticos, p-nitroitrobenceno, que inhibe a la mayoría de los hongos, pero no a *Fusarium* sp.

4. **modificando las condiciones de incubación** (altas temperaturas, por ejemplo) se facilita el desarrollo de termófilos, la anaerobiosis inhibe a los aerobios, etc. Estos procedimientos son muy útiles para aislar bacterias difíciles de identificar por simple examen microscópico. En cambio, en otros grupos de protistas como hongos y algas, la diversidad morfológica facilita su reconocimiento.

El cuadro 8 resume principios de aislamiento para numerosos microorganismos.

Cuadro 8- Técnicas de enriquecimiento para aislar bacterias de la naturaleza

Fototrófas a la luz, principal fuente de carbono: CO_2

aerobiosis		
	organismos enriquecidos	**inóculo**
N_2 como fuente de N	cianobacterias	agua de pozo, lodos, tierra húmeda a la luz
anaerobiosis		
H_2, ác.orgánicos, N_2 H_2S donador de e^-	bacterias purpúreas no sulfurosas	lodos ricos en sulfuros
	bacterias sulfurosas purpúreas y verdes	

Quimiautolitotróficas en la oscuridad: fuente de C (CO_2)

aerobiosis			
donador de e^-	**aceptor de e^-**	**organismos**	**inóculo**
NH_4^+	O_2	*Nitrosomonas*	tierra, lodos
NO_2^-	O_2	*Nitrobacter*	aguas servidas
H_2	O_2	bacterias del H_2	biodigestores anaerobios
H_2S, Sº, $S_2O_3^=$	O_2	*Thiobacillus spp*	suelos
Fe^{+3}, pH bajo	O_2	*T. ferrooxidans*	suelos
anaerobia			
Sº, $S_2O_3^=$	NO_3^-	*T. denitrificans*	suelos, lodos
H_2	CO_2	metanogénicas	biodigestor, lodos, rumen
H_2	NO_3^-	*Paracoccus denitrificans*	

Quimiorganotróficas en la oscuridad, fuente de C compuestos orgánicos
aerobiosis, respiración aerobia

componentes	**aceptor de e^-**	**organismos**
lactato, NH_4^+	O_2	*Pseudomonas fluorescens*
vegetación en descomposición	pasteurizar	(80ºC) para enriquecer en *Bacillus*
almidón, NH_4^+	O_2	*Bacillus polymyxa,* otros *Bacillus* spp
etanol (4%)+ 1%	O_2	*Acetobacter, Gluconobacter*
extracto de levadura pH 6, hidrocarburos (ej.aceite mineral), amonio	O_2	*Mycobacterium, Nocardia*
celulosa, amonio	O_2	*Cytophaga, Sporocytophaga*
azúcares, N_2	O_2	*Azotobacter*

anaerobiosis, respiración anaerobia		
componentes	**aceptor e^-**	**Organismos, inóculo (**tierra, lodo, sedimentos de lagos)
ácido orgánico	KNO_3(2%)	*Pseudomonas* (especies desnitrificantes)
extracto de levadura	KNO_3(10%)	*Bacillus*
ácidos orgánicos	Na_2SO_4	*Desulfovibrio, Desulfotomaculum*
CH_3OH	Na_2CO_3	*Methanosarcina barkeri*
CH_3NH_2	KNO_3	*Hyphomicrobium*
anaerobiosis, fermentación		
glutamato	*Clostridium*	lodo, sedimentos
histidina	*Tetanomorphum*	vegetales en descomp., lácteos, rumen, aguas servidas
almidón, amonio	*Clostridium* spp	" "
almidón, N_2	*C. pasteurianum*	" "
glucosa, extracto de levadura, pH 5	bacterias del ácido láctico, *Lactobacillus* *Streptococcus*	" " pastos, tambos, suelos

En resumen: la práctica de aislamiento tiene por objeto la obtención de cultivos puros, formados por la progenie o clon de una sola célula, en general en forma de colonia a partir de una célula. Las colonias se describen en función de su: tamaño, forma, borde, elevación, color, olor, que ayuda en la identificación (caracteres culturales en medio sólido). A partir de colonias aisladas se realiza un examen microscópico (morfología, coloración de Gram) que brindan los caracteres morfológicos y tintoriales. Las colonias se reaislan por repique en medio no selectivo para asegurarse su pureza.

Preguntas de repaso

1) Conceptos y ejemplos de:
   - Nutriente
   - Medio de cultivo
   - Condiciones de cultivo

2) Señale: ejemplos de microorganismos auto y heterotróficos, asi como aquellos de mayor capacidad biosintética. Cuales son los más distribuidos en la naturaleza?

3) Complete el siguiente cuadro indicando la forma química en que los principales elementos se usan como nutrientes a vegetales, animales y microorganismos

Elemento	vegetales	animales	microorganismos
C			
N			
S			
P			
Fe			
Ca			
Mn			
Micronutrientes			

4) Clasifique nutricionalmente a los siguientes microorganismos

	A	B	C	D
C-CO_2	+	-	+	+
C-orgánico	-	+	-	-
Luz	+	-	-	+
Reacciones químicas	-	+	+	-
Donadores de electrones	H_2O	orgánico	NH_4^+	ác. acético

Clasificación:

Ejemplos:

5) Relativa al cuadro 7

i)Clasifique los medios de cultivo (1...5) por su empleo en el laboratorio

ii) Señale los factores de crecimiento presentes en los medios y su rol en la célula

ii) Cómo haría diferencial al medio 3?

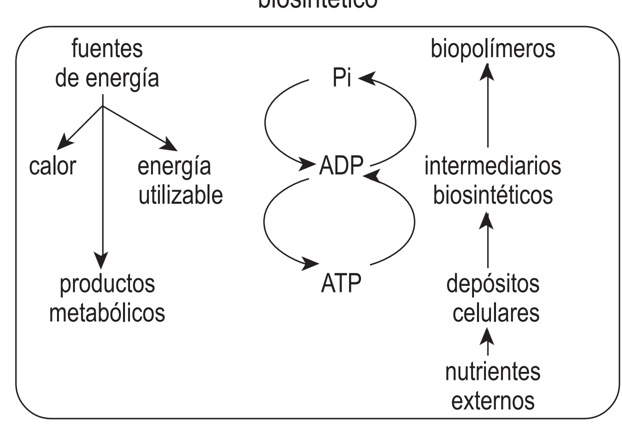
iv) Cómo trabajaría en anaerobiosis con el medio 4?

v) Rol del par fosfato en los medios de cultivo

Metabolismo bioenergético en los microorganismos

El cuadro 9 es un clásico esquema sobre la utilización de los nutrientes con el objeto de obtener energía o con fines biosintéticos. Se abordarán distintos aspectos relacionados a los mecanismos de obtención de energía por los microorganismos, que como todo organismo, emplean los tres tipos de procesos: **fermentación, fotosíntesis y respiración** (cuadro 10).

Cuadro 9- Metabolismo bioenergético y biosintético



Los mecanismos de biosíntesis de distintas macromoléculas, como hidratos de carbono, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, no serán analizadas ya que los procesos no difieren mayormente en la escala biológica. En efecto, el equipo enzimático y los mecanismos bioquímicos suelen ser similares en una bacteria y en organismos superiores, incluido el hombre.

Cuadro 10- Estrategias bioenergéticas en microorganismos

Fermentaciones

Donadores y aceptores de electrones compuestos orgánicos

Rinde poca energía (E) y nada de poder reductor. Ej: fermentaciones láctica y alcohólica

Respiraciones

Donadores de e- pueden ser orgánicos o inorgánicos, los aceptores son en general inorgánicos:

O_2 (aerobia)

$CO_3^=$, $SO_4^=$, NO_3^-, Fe^{+++} (anaerobia)

Fotosíntesis

Transformación de energía lumínica en química por fotofosforilación

Oxigénica (la superior), libera O_2

Anoxigénica (bacterias anaerobias, no liberan O_2)

Cuadro 11- Objetivos del metabolismo bioenergético

i) obtención de energía

* nivel del sustrato:

ác.2P-glicérico → ác.P-enol pirúvico → ác. pirúvico +ATP

* transporte de electrones (CTE en membranas): fosforilación oxidativa, fotofosforilación

Reacciones de biosíntesis

ii) poder reductor

* autotrofia: CO_2 → Corgánico

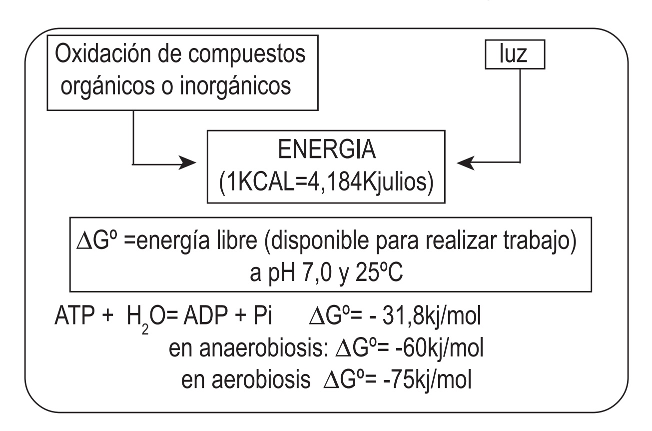
* transferencia de poder reductor:

sustrato oxidado + NADH → sust.reducido+ NAD^+

Breve repaso sobre bioenergética

Todos los procesos generadores de energía (cuadro 12) se caracterizan por la transferencia de electrones desde una sustancia con mayor poder reductor hacia una con menor energía libre. El cuadro 13 muestra diversos pares redox. Volveremos a él cuando se presenten procesos redox realizados por los microorganismos con materia orgánica y mineral.

Cuadro 12- Generación de energía



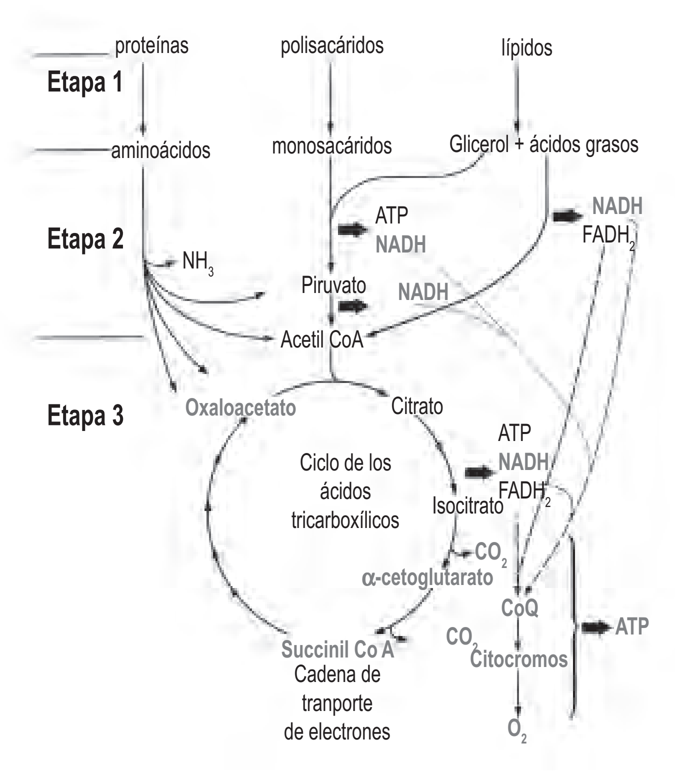


Figura 1- Degradación de distintos sustratos por microorganismos (Prescott *et al.,* 1999)

Cuadro 13- Potenciales redox

Semi reacción	Eo [v]
$6CO_2 + 24H^+ + 24e^- = C_6H_{12}O_6 + 6H_2O$	-0.43
$2H^+ + 2e^- = H_2$	-0.41 **
$NAD^+ + 2H^+ + 2e^- = NADH + H^+$	-0.32
$CO_2 + HCO_3^- + H^+ + e^- = CH_3COO^- + 3H_2O$	-0.29
$CO_{2(g)} + 8H^+ + 8e^- = CH_{4(g)} + 2H_2O$	-0.25 **
$S_{(s)} + 2H^+ + 2e^- = H_2S_{(g)}$	-0.24
$SO_4^{-2} + 9H^+ + 8e^- = HS^- + 4H_2O$	-0.22 **
piruvato + $2H^+ + 2e^-$ = lactato	-0.19
$NO_3^- + 10H^+ + 8e^- = NH_4^+ + 3H_2O$	0.36
$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- = NO_2^- + H_2O$	0.42
$CHCl_3 + H^+ + 2e^- = CH_2Cl_2 + Cl^-$	0.56
$CCl_4 + H^+ + 2e^- = CHCl_3 + Cl^-$	0.67
$2NO_3^- + 12H^+ + 10e^- = N_2 + 6H_2O$	0.74 **
$Fe^{+3} + e^- = Fe^{+2}$	0,76
$O_2 + 4H^+ = 2H_2O$	0.82

Catabolismo de hidratos de carbono en microorganismos

La figura 1 y el cuadro 14 resumen la degradación de distintos sustratos orgánicos por algunas de las vías presentes en los microorganismos: la glicólisis, la vía de las pentosas fosfato y su continuidad en las fermentaciones o la entrada al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC) y la reoxidación de las coenzimas reducidas por fermentación o quimiósmosis. La figura 2 (Prescott *et al.*, 1999). repasa la glicólisis, por la cual un microorganismo obtiene una ganancia neta de 2 ATP y 2 NADH/mol de glucosa, en ausencia de oxígeno.

- muchos azúcares-P pueden ser convertidas en glucosa-6P
- 2 ATP se invierten en la producción de fructosa (C6) bifosfato
- Fructosa 1,6-bi-P se corta en dos moléculas intercam-

biables con 3-carbonos

- Cada molécula se usa para sintetizar 2 ATP vía fosforilación a nivel del sustrato, reducir 1 NAD+ a NADH y producir piruvato como producto final
- Ganancia neta: 2 ATP/glucosa
- No requiere O_2

Cuadro 14- Metabolismo de los hidratos de carbono por microorganismos

- Catabolismo de azúcares a piruvato vía:
  - Glicolisis
  - Pentosa fosfato
  - Entner-Doudoroff
- Destino del piruvato
  - Fermentación
  - Ciclo de los ATC
- Destino del NADH
  - Fermentación

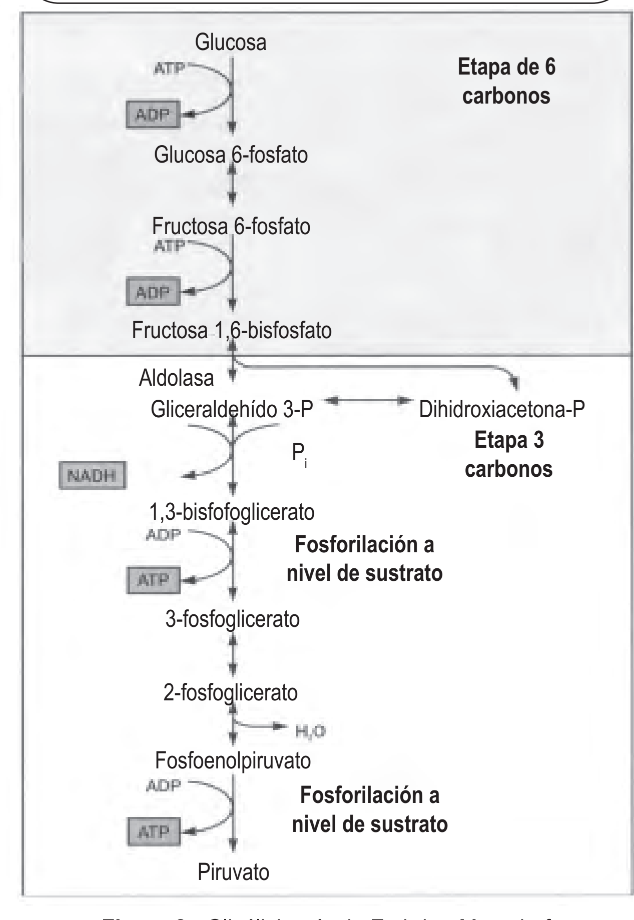
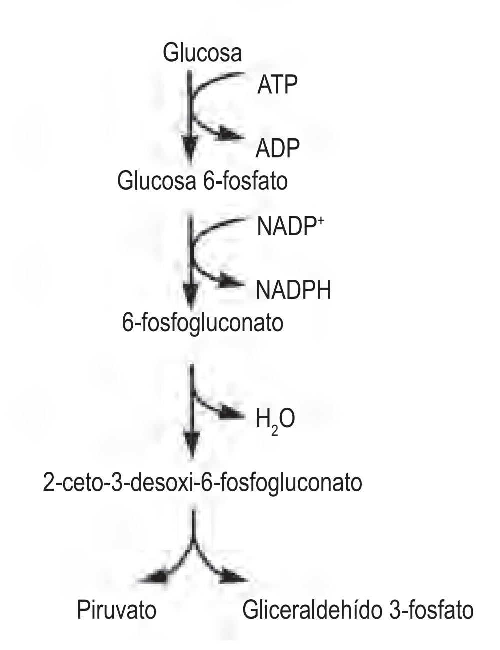


Figura 2- Glicólisis, vía de Embden-Meyerhof

La figura 3 presenta metabolismos alternativos al piruvato: la vía de Entner-Doudoroff y la de la pentosa fosfato. Las bacterias presentan todos los metabolismos de degradación de hidratos de carbono descriptos.



- Entner-Doudoroff
  rinde: -1 ATP/glucosa
  -2 NAD(P)H
- Pentosa fosfato
  Glucosa -6-P oxidada, produce CO_2
  Interconversiones entre azúcares con 3, 4, 5, 6, 7 C
  Importante en la formación de NADPH para anabolismo, ribosa para ácidos nucleicos

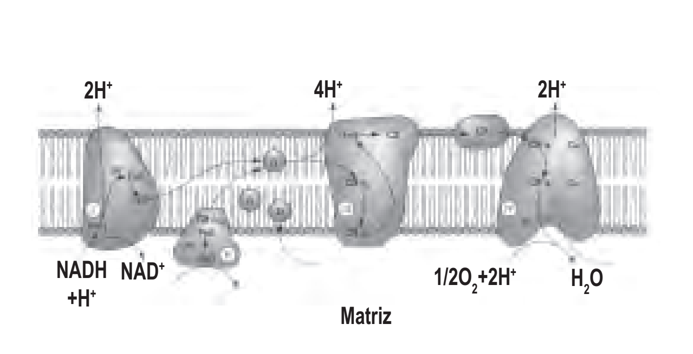
Figura 3- Metabolismo alternativo al piruvato

Fermentaciones

Constituyen procesos redox de generación de ATP en donde los donadores y aceptores de electrones son moléculas orgánicas, en general derivadas del mismo sustrato. La figura 4 compara a las fermentaciones con las respiraciones.

El NAD(P) requerido para la glicólisis y otros mecanismos de síntesis del piruvato debe ser regenerado.

En la respiración, los aceptores de electrones son en general inorgánicos y en las fermentaciones son orgánicos, usualmente el piruvato y sus derivados.



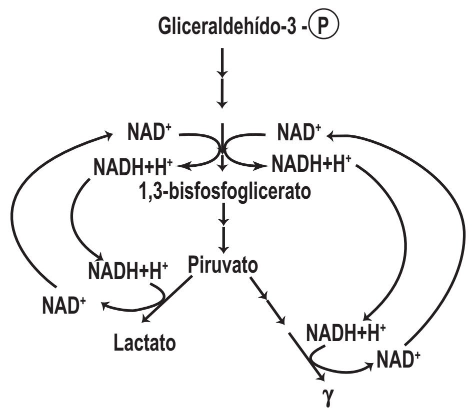


Figura 4- Comparación entre la respiración y la fermentación (Prescott *et al.*, 1999)

Rendimientos energéticos

38 ATP/glucosa en la respiración con O2:

* 10 NADH x 3ATP= 30 ATP
* 2FADH2 x 2 ATP = 4 ATP
* 2ATP + 2 GTP = 4 ATP

2 ATP/ glucosa en las fermentaciones

Menos de 2-6 ATP/glucosa en respiraciones anaerobias: los electrones entran en general pos los citocromos. El NAD^+ se regenera por flujo inverso de electrones con gasto de ATP (figura 10).

Características de las fermentaciones

i) Diferentes organismos liberan distintos productos por las fermentaciones (ácidos, alcoholes, solventes, H_2) que son usados para su identificación y aprovechados por el hombre

ii) Mucha energía de los azúcares se pierde en las fermentaciones como "productos de deshecho", es un proceso ineficiente

iii) El poder reductor generado en la vía glicolítica se usa en la reducción del piruvato. No se general poder reductor

El cuadro 15 presenta el esquema general de las tres fermentaciones con mayores aplicaciones biotecnológicas:

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CO_2 + CH_3CH_2OH$ **Alcohólica**

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CHOHCOOH$ **Homoláctica**

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CO_2 + CH_3CH_2OH + CH_3CHOHCOOH$ **Heteroláctica**

Los sustratos son en general azúcares, aunque muchos microorganismos pueden usar proteínas, aminoácidos, para obtener energía por esta vía. Los donadores y aceptores de electrones surgen de la degradación del sustrato.

La molécula clave en este proceso es el **ácido pirúvico** producido en la vía glicolítica, donde se generan los donadores de electrones para las distintas fermentaciones (triosa-P). El tipo de fermentación dependerá de las enzimas que posea el microorganismo y de las condiciones del ambiente.

Los tipos de fermentaciones sirven también para identificar microorganismos (figura 5) (Prescott *et al.*, 1999).

Cuadro 15- Fermentaciones alcohólica y láctica

fermentación	donador de e^-	aceptor de e^-	enzimas	productos finales
alcohólica	triosa-P	acetaldehido	deshidrogenasa alcohólica	CO_2, etanol
homoláctica	triosa-P	ácido pirúvico	deshidrogenasa láctica	ácido láctico

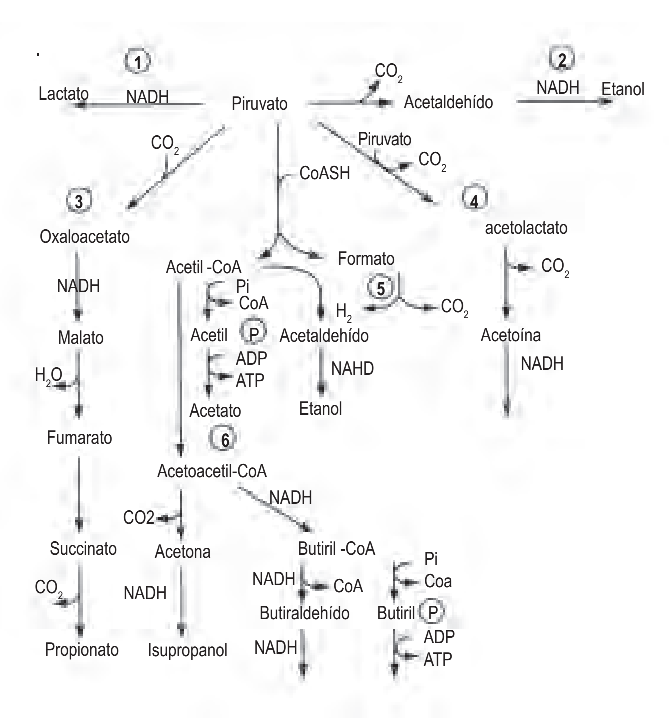


Figura 5- Tipos de fermentaciones

Fermentación alcohólica

La enzima involucrada es la deshidrogenasa alcohólica, el donador de electrones se encuentra en la vía glicolítica (triosa-P) y los productos finales son el etanol y el CO_2. Se realiza en el músculo y entre los microorganismos son sobre todo los hongos y entre ellos las levaduras, como *Saccharomyces cereviseae*, son muy empleadas en la producción industrial de etanol, en la vinificación, en la panificación (el CO_2 es el agente levador, el etanol se volatiliza en el horno).

El empleo de distintas sustancias químicas que al humedecerse y con la temperatura liberan CO_2 (tartratos, bicarbonatos) empelados en los polvos de hornear, no ha podido sustituir a las levaduras, que dan a la masa un sabor y textura muy particular.

El cuadro 16 resume las múltiples aplicaciones biotecnológicas de la fermentación alcohólica, una de las más empleadas, junto a la fermentación láctica, a nivel industrial. Ya vimos el uso del agua o del extracto de levaduras en los medios de cultivo, como fuentes de aminoácidos, de carbono y de factores de crecimiento (vitaminas y otros).

Cuadro 16- Aplicaciones de la fermentación alcohólica

- levadura del pan
- como alimento, complemento proteico
- aditivos en medios de cultivo: agua y extracto de levadura (vitaminas, aminoácidos, etc.)
- producción de etanol como solvente, combustible
- producción de bebidas: vino, cerveza, sidra. destiladas: ron, whisky, etc.

Fermentación láctica

La enzima clave es la deshidrogenasa láctica que actúa con NAD y la realizan las llamadas bacterias ácido-lácticas, algunos hongos y el músculo de los animales. Producen casi exclusivamente ácido láctico (figura 6).

Fermentación heteroláctica

Las bacterias carecen de enzimas de la vía glicolítica (aldolasa y triosafosfato isomerasa) y la degradación de la glucosa se realiza por la **vía del fosfogluconato**: oxidan glucosa-6P a 6-fosfogluconato que luego decarboxilan a pentosa-P. Esta se transforma en triosa-P y acetil-P por la enzima **fosfocetolasa**. La triosa da ácido láctico con la formación de un mol de ATP, mientras que el acetil-P acepta electrones a partir de los NADH generados en la producción de pentosa-P y se convierte en etanol sin producción de ATP.

El rendimiento energético es menor: 1 solo mol de ATP, en lugar de 2 como en los homofermentadores, que producen el doble de biomasa por mol de azúcar fermentado.

No se acumula poder reductor (figura 7).
La producción de CO_2 es una forma sencilla de distinguir un grupo de otro. Importantes productos son formados en estos procesos, que el hombre ha aprovechado desde muy antiguo, incluso antes de conocerse el rol de los microorganismos en el proceso.

El balance energético es muy bajo, 2 ATP en las fermentaciones alcóholica y láctica y 1 en la heteroláctica. No se genera poder reductor, por lo cual el micro-

organismo debe oxidar gran cantidad de sustrato para lograr desarrollarse.

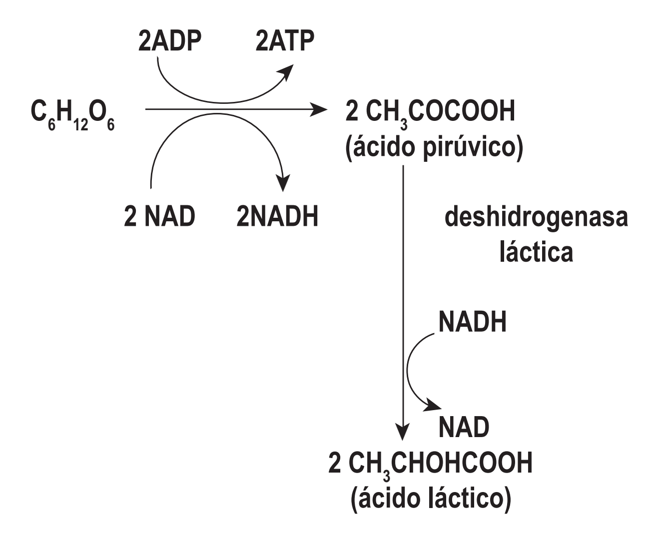


Figura 6- Fermentación homoláctica

Se cree que es el metabolismo bioenergético más antiguo, cuando no existía el O_2. Los microorganismos fermentadores se han adaptado a las nuevas condiciones de la atmósfera, realizando el mismo proceso que sus ancestros.

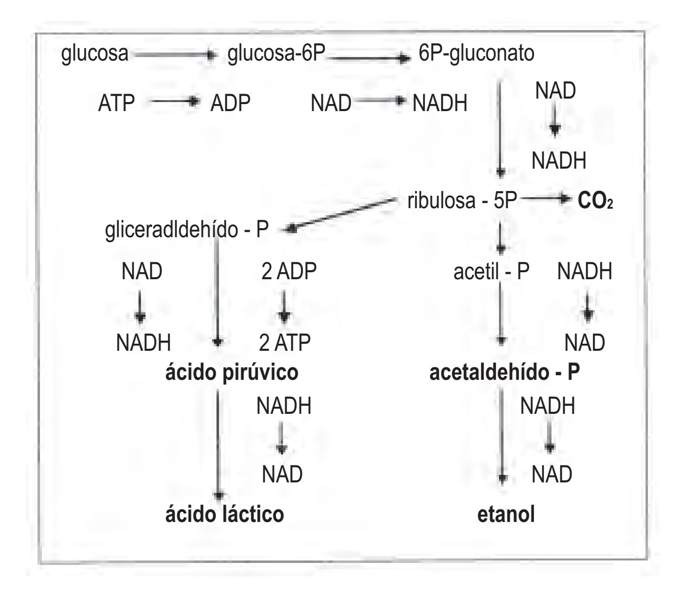


Figura 7- Fermentación heteroláctica

Bacterias acidolácticas

Son quizás unas de las bacterias más estudiadas y cultivadas por su importancia económica ya que participan en las transformaciones de un alimento tan importante como la leche y son responsables de aplicaciones biotecnológicas en derivados de la leche: leches agrias y yogur, quesos. La producción de ácido láctico hace que el producto se estabilice, evitando el deterioro microbiano. Este proceso se emplea también en la conservación de pasturas y granos en el proceso conocido como ensilaje, tema que será tratado en el capítulo 18.

La figura 8 (Prescott *et al.*, 1999) presenta características de representantes de los tres géneros más distribuidos: *Lactobacillus, Streptococcus y Leuconostoc*. En base a la composición de (G+C)% en el ADN y el tipo de fermentación que realizan, en esta familia se incluyen los géneros: *Lactobacillus, Streptococcus y Leuconostoc, Pediococcus, Enterococcus, y Lactococcus.* Se encuentran muy distribuidas en la naturaleza: en pastos, cuerpo del ganado, leche. Algunas especies son habitantes del intestino y mucosas y pueden encontrarse representantes patógenos.

Por más detalles y aplicaciones biotecnológicas de estas bacterias, se remite al capítulo 19.

Otras **fermentaciones** producen moléculas de gran valor económico: acetona, butanol, propanol, ácido acético, butírico, H_2, etc. Y muchas veces resulta más económica su producción vía fermentaciones que por síntesis química.

Respiraciones

Constituye un proceso redox de obtención de energía en donde los donadores de electrones pueden ser compuestos orgánicos o inorgánicos, pero los aceptores son por lo general inorgánicos (O_2 o compuestos distintos al O_2). La ecuación general de las respiraciones se puede esquematizar:

$$\mathbf{AH_2 + B \xrightarrow{CTE} A + BH_2}$$

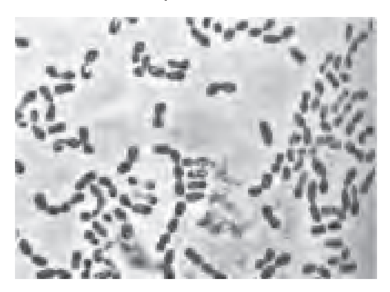
A y B donador y aceptor de electrones, **CTE** cadena transportadora de electrones



Lacobacillus



Streptococcus



Leuconostoc

Figura 8- Bacterias lácticas

Todos los organismos que la realizan son quimiotrofos ya que obtienen la energía de reacciones redox. Según la naturaleza de los aceptores de electrones se distinguen dos tipos de respiraciones: aerobias y anaerobias.

En cualquiera de los casos los donadores de electrones pueden ser orgánicos (lo más frecuente y eficiente) o inorgánicos.

La figura 9 relaciona los sustratos orgánicos e inorgánicos con los aceptores de electrones inorgánicos, en los distintos tipos de respiraciones.

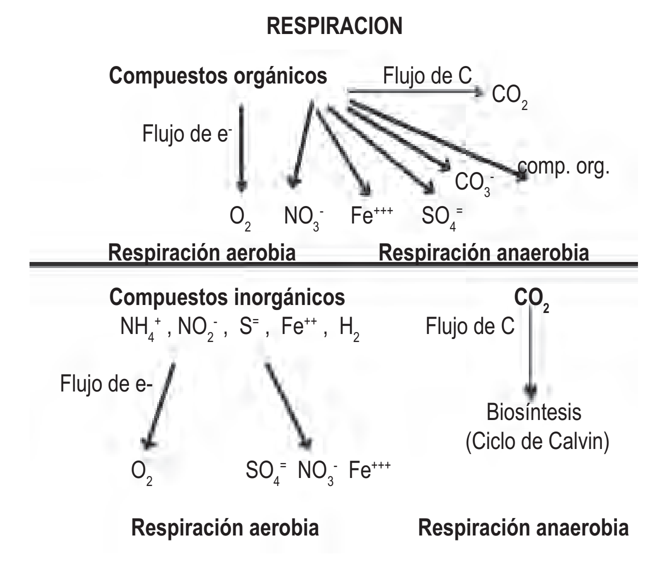


Figura 9- Flujos de carbono y electrones en las respiraciones

Respiraciones aerobias

Con sustrato orgánico

Los microorganismos son capaces de respirar moléculas orgánicas de naturaleza muy diversa, en orden decreciente de empleo se pueden señalar: azúcares, alcoholes, proteínas, aminoácidos, ácidos orgánicos, hidrocarburos, almidón, pectinas, celulosa, lignina, pesticidas. La presencia de una cadena transportadora de electrones (**CTE**) que incluye varias moléculas como NAD, FAD, citocromos y culmina en el O_2, es característica de este proceso. La degradación de un mol de glucosa por esta vía rinde 38 ATP, luego del acople con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O \quad (647\ kcal/mol)$$

Esta es una respiración aerobia **completa,** ya que el sustrato es oxidado completamente a CO_2 y agua, liberando toda la energía de la molécula. Los sustratos orgánicos son degradados muy rápidamente por esta vía.

Existen casos en los que los organismos carecen de enzimas del ciclo de Krebs y no pueden llevar el sustrato a CO_2, son las respiraciones con sustrato orgánico **incompletas**:

$$CH_3CH_2OH + O_2 \longrightarrow CH_3COOH$$

(preparación de vinagre)

etanol ácido acético

Estas respiraciones poseen importantes aplicaciones biotecnológicas por |os productos formados, ácidos glucurónicos, ácido acético, etc.

Con sustrato inorgánico

Proceso sólo realizado por bacterias quimioautotróficas que pueden generar energía en la oxidación de compuestos minerales, en aerobiosis, Estas reacciones están acopladas con la reducción del CO_2, mediante el ciclo de Calvin al igual que en la fase oscura de la fotosíntesis:

$$6\ CO_2 + 18\ ATP + 12\ NADPH \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 18\ ADP + Pi + 12\ NADP^+$$

Reconocemos 5 grupos de respiraciones aerobias con sustrato inorgánico (cuadro 17). La energía que liberan estas reacciones es escasa, ya que los electrones entran a nivel de los **citocromos a y b** liberando entre 1 y 2 ATP. Como se aprecia las cadenas son más cortas que en las respiraciones aerobias y las coenzimas NADH son reoxidadas mediante un transporte inverso de electrones, con consumo de energía (figura 10).

Cuadro 17- Bacterias quimioautótrofas aerobias

Oxidantes de	Ecuación (ATP)	Grupo Fisiológico
amonio	$NH_4^+ + 1{,}5O_2 = NO_2^- + H_20$	Nitritantes
nitrito	$NO_2^- + 0{,}5\ O_2 = NO_3^- + H^+$	Nitratantes
azufre	$(H_2S, S^o, S_2O_3^=, S_3O_6^=) + O_2^= = SO_4^=$	Sulfooxidantes
hierro	$Fe^{++} + O_2 = Fe^{+++} + H_2O$	Ferroxidantes
hidrógeno	$H_2 + O_2 = H_2O$	Oxidantes del H_2

Estas bacterias crecen por lo tanto muy lentamente, su tiempo de generación es alto y la turbidez en medios de cultivo es apreciable luego de más de 3 semanas de crecimiento. En los litotrofos la generación de ATP es en principio similar que en los organotrofos, excepto que los donadores de electrones son sustancias inorgánicas. Así, el ATP se acopla a la **oxidación del donador de electrones** y la energía de reducción se obtiene directamente a partir del compuesto inorgánico, si tiene potencial redox suficientemente bajo, o por reacciones de transporte inverso de electrones.

El cuadro 18 resume los potenciales redox en estas respiraciones que indica que varios compuestos inorgánicos que pueden dar al oxidarse con el O_2, energía suficiente para la síntesis de ATP.

Cuadro 18 - Producción de energía a partir de la oxidación de varios donadores inorgánicos de electrones

Reacción	ΔGº (kJ/reacción)
$HS^- + H^+ + 0{,}5O_2 \longrightarrow S^o + H_20$	-203,2
$S^o + 0{,}5O_2 + H_2O \longrightarrow SO_4^= + 2H^+$	-589,1
$NH_4^+ + 0{,}5O_2 \longrightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O$	-260,2
$NO_2^- + 0{,}5\ O_2 \longrightarrow NO_3^-$	- 75,8
$Fe^{++} + H^+ + 0{,}25\ O_2 \longrightarrow Fe^{+++} + 0{,}5\ O_2$	- 71,2

En Fe^{++} se calculó a pH 2-3, las otras a pH 7,0 - Los datos son valores promedios a los efectos de comparación.

Su rol puede resultar muy importante en la naturaleza por la liberación de iones fundamentales para las plantas: nitratos, sulfatos. La oxidación del hierro conduce a la formación de $Fe(OH)_3$ insoluble, indisponible para los cultivos. Esta sustancia produce obstrucciones en las cañerías de hierro atacadas por las ferrobacterias.

Respiraciones anaerobias

Constituyen procesos realizados solamente por protistas inferiores (bacterias) en anaerobiosis. Los distintos tipos se presentan en la figura 9. El flujo de electrones en las respiraciones, sus cadenas transportadoras de electrones (CTE) se aprecia en la figura 4.

Los rendimientos energéticos, son muy superiores en las respiraciones aerobias con sustratos orgánicos.

Las cadenas transportadoras de electrones en las respiraciones anaerobias son más cortas, entrando los mis-

mos a nivel de los citocromos, con lo cual el rendimiento energético no supera los 2-3 o algo más de moles de ATP por mol de sustrato oxidado. Las coenzimas deben ser reoxidadas por flujo inverso de electrones con gasto de ATP (figura 10). Estos metabolismos son muy antiguos y poco eficientes.

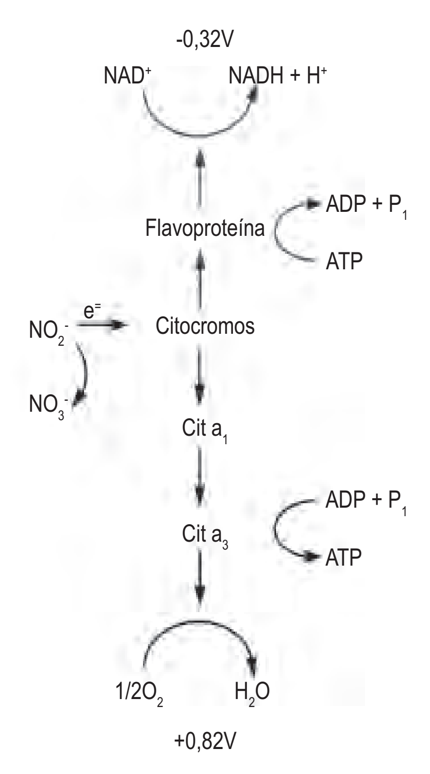


Figura 10- Flujo inverso de electrones para reducir coenzimas (NAD, FAD)

Aceptor nitratos (desnitrificación)

Proceso **perjudicial para las plantas** ya que utiliza a los a los nitratos, que se reducen a N_2 que se pierde en la atmósfera pero el proceso es **benéfico para el ambiente,** ya que es la forma de eliminar los nitratos (tóxicos para el hombre y animales) hacia la atmósfera. La desnitrificación cierra el ciclo del nitrógeno en la naturaleza (capítulo 10).

La desnitrificación heterótrofa (cuadro 19) es la más difundida y es realizada por bacterias capaces de realizar la **reducción desasimilativa** de los nitratos, en ausencia de O_2. Estas bacterias son **anaerobias facultativas,** es decir que poseen dos cadenas transportadoras de electrones para la oxidación del mismo sustrato: una aerobia, que le rinde más energía y otra anaerobia, más corta, que rinde entre 2 y 3 ATP por mol de glucosa.

Cuadro 19- Reducción de los nitratos

Bacterias anaerobias facultativas: *Pseudomonas, Bacillus, Spirillum, Micrococcus*

Heterótrofas

$CH_3COOH + NO_3^- \longrightarrow CO_2 + N_2\,(N_2O) + OH^-$

Sustrato variado: productos de degradación de polímeros: celulosa, pectinas, almidón

Autótrofas

$S^o, S_2O_3^= + NO_3^- + H_2O \longrightarrow SO_4^= + N_2\,(N_2O) + H^+$

$H_2 + NO_3^- \longrightarrow N_2\,(N_2O) + H_2O$

Thiobacillus denitrificans, único representante del género con metabolismo anaerobio

Hidrogenomonas agilis, *Micrococcus denitrificans*

Condiciones para maximizar el proceso

- alto nivel de donadores de electrones (de preferencia orgánicos)
- alto nivel de de nitratos
- anaerobiosis

Como los nitratos se forman en aerobiosis, una **alternancia** de períodos de aerobiosis y de anaerobiosis (lluvias y anegamiento seguidos de aireación en suelos) estimula mucho este proceso que resulta muy importante en la depuración de aguas altamente contaminadas: el nitrógeno orgánico se mineraliza a nitratos en aerobiosis y se desnitrifica volatilizándose a la atmósfera como N_2 por respiración anaerobia.

Aceptor sulfatos (sulfatorreducción)

Este proceso es realizado por un grupo de bacterias **anaerobias estrictas,** es decir que sólo pueden crecer en anaerobiosis. Los géneros más conocidos son *Desulfotomaculum, Desulfovibrio* (cuadro 20).

El proceso perjudica a las plantas que emplean sulfatos, pero es favorable en la depuración de cursos de aguas contaminadas, pues volatiliza formas combinadas de azufre, como gas H_2S (capítulo 12).

Cuadro 20- Reducción de los sulfatos

Bacterias anaerobios estrictas, G-, bacilos con flagelos polares
Heterótrofas
$CH_3CH_2OH + SO_4^{=} \longrightarrow CH_3COOH + 2CO_2 + S^{=} + 2H_2O$
Autótrofas
$H_2 + SO_4^{=} \longrightarrow 2H_2O + S^{=}$
Los sulfuros (H_2S, volátil y tóxico para vegetales (precipitan con metales ⟶ FeS (insoluble)

Aceptor carbonatos (CO_2) Metanogénesis
Proceso muy importante en la naturaleza, permite la degradación de moléculas orgánicas hasta la producción de gas metano (cuadro 21).

Cuadro 21- Reducción de los carbonatos (CO_2)

Hidrogenotrófica: $CO_2 + 4H_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O$ (autótrofas)
Acetilclástica $CH_3COOH \longrightarrow CO_2 + CH_4$
Methanosarcina, Mathanobacillus, Methanococcus
Metilotrófica: usan metilamina, metilsufuros (heterótrofas)

El CO_2 (carbonatos) actúa como donador y el H_2 como aceptor de electrones (autotróficas)

En la metanogénesis acetoclástica, las bacterias quimioheterótrofas pueden desdoblar el ácido acético en metano y CO_2.

La mayoría de las bacterias metanogénicas son **Archeobacterias**, o sea las bacterias más primitivas, que sólo crecen en ambientes desprovistos de O_2, muchas veces actúa más de una especie, sinérgicamente y resulta difícil su aislamiento en cultivo puro.

Una importante aplicación de este proceso microbiano lo constituye la biotransformación de residuos orgánicos en:

- **biogás** (mezcla de gases donde predomina el metano, con H_2, CO_2, etc) y
- **biofertilizante** un resto no contaminante que contiene la fracción lignocelulósica de los restos orgánicos y biomasa microbiana que lo hace apto para uso como mejorador de suelos.

Cuadro 22- Reducción de iones férricos (ferrireducción)

$MO + Fe^{+++} \longrightarrow CO_2 + H_2O + Fe^{++}$ (soluble)
Complejos organo-metálicos
Sideróforos + $Fe^{+++} \longrightarrow$ el complejo entra a la célula y ⟶ se reduce en el citoplasma (Fe^{++} asimilable) (reductasa-férrica)
Corrosión anaerobia de metales
$4Fe + SO_4^{=} + H_2O \longrightarrow SFe + 3Fe(OH)_2$ (soluble) + OH^-

Este proceso es muy aplicado en el tratamiento de residuos de tambos (estiércol), restos de cosechas y en la depuración de efluentes de fábricas, en anaerobiosis y es tratado en el capítulo 21.

El cuadro 22 resume la intervención del hierro en procesos redox anaerobios, que lleva a los iones férricos insolubles y no aprovechables por las plantas a formas reducidas ferrosas, solubles (capítulo 12).

Fotosíntesis

Constituye un proceso redox de conversión de la energía lumínica en energía química (ATP). La energía de la luz se emplea para reducir CO_2 o compuestos orgánicos menos reducidos a moléculas orgánicas (azúcares), por organismos aerobios y anaerobios.

Tipos de fotosíntesis en los microorganismos

1) $CO_2 + 2H_2O \longrightarrow (CH_2O)n + H_2O + O_2$ (oxigénica)
2) $CO_2 + H_2S \longrightarrow (CH_2O)n + S^o$ (anoxigénica)
3) $CO_2 + CH_3COOH \longrightarrow (CH_2O)n + H_2O$ "
4) $CH_3COOH \longrightarrow (CH_2O)n + H_2O$ "

La oxigénica (tipo 1) es la realizada por los vegetales y entre los microorganismos por las **algas** (protistas superiores) y las **cianobacterias** (protistas inferiores), libera

oxígeno y 2 ATP y 2 NADPH+ por vuelta y emplea agua como donador externo de electrones (litotrofos). Es considerada más reciente en la evolución en relación a la anoxigénica. Los microrganismos poseen dos fotosistemas: I generador de ATP y poder reductor y el II que libera O_2 consecuencia de la fotólisis del agua (figura 11).

El cuadro 23 presenta a los microorganismos fotosintéticos, eucariotas y procariotas. Es curiosa la posición de las cianobacterias, que poseyendo estructura celular procariota han evolucionado en la función fotosintética, al emplear el agua como donador externo de electrones.

Cuadro 23- Diversidad de organismos fotosintéticos

eucariotas	**procariotas**
plantas superiores	cinaobacterias
algas filamentosas y unicelulares (diatomeas, euglenoides, dinoflagelados)	bacterias sulfurosas verdes y purpúreas
	bacterias no sulfurosas verdes y purpúreas

La fotosíntesis anoxigénica (tipos 2, 3 y 4) es más primitiva, es conocida como fotosíntesis bacteriana, o cíclica, los electrones de la clorofila bacteriana, o bacterioclorofila, que absorbe en el infrarojo (700-800nm), vuelven a ella por lo que genera sólo 1 ATP por vuelta de los electrones. Se realiza en **anaerobiosis** y surgió cuando en la atmósfera no había oxígeno. El NADP+ es reducido por flujo inverso de electrones o directamente por los donadores externos de electrones en reacción independiente de la luz (cuadro 24).

Cuadro 24- Reducción de NAD+ en bacterias verdes y purpúreas

ATP	⟶	**ADP + Pi**
H_2S, Sº + NAD+ ac. orgánicos succinato	⟶	Sº, $SO_4^{=}$ + NADH + H^+ fumarato

El tipo 2) es realizado por las bacterias fotosintéticas sulfurosas purpúreas y verdes: *Chromatiaceae y Chlorobiaceae* (géneros más conocidos: *Chromatium y Chlorobium)* distinguibles por sus pigmentos. Usan H_2S o H_2 como donadores de electrones. El Sº acumulado en las células puede ser empleado como fuente de energía cuando crecen en quimiotrofia, sin luz. Crecen en barros o aguas en donde hubo anaerobiosis (producción de H_2S).

El tipo 3) y 4) lo realizan integrantes de una sóla familia de bacterias fotosintéticas no sulfurosas: *Rhodospirillaceae* (género *Rhodospirillum*). No pueden emplear H_2S ni H_2 como donadores de electrones, pero si moléculas orgánicas simples, como ácidos o alcoholes. El tipo 4) no puede reducir el CO_2 (la forma más oxidada del carbono) con la energía de la fotosíntesis, la que sólo le alcanza para reducir moléculas de estado de oxidación intermedio (ácidos) hasta carbohidratos.
Son **fotoheteroorganotrofas**.

La mayoría de las bacterias fotosintéticas anaerobias se desarrollan en ambientes anegados, barros, capas subsuperficiales de suelos, sucediendo a las bacterias sulfatorreductoras, que liberan ácido sulfhídrico en anaerobiosis. También la mayoría es capaz de fijar N_2, por lo que constituyen una importante herramienta de estudio; el flujo electrónico de la fotosíntesis es capaz de reducir CO_2 y N_2 en anaerobiosis.

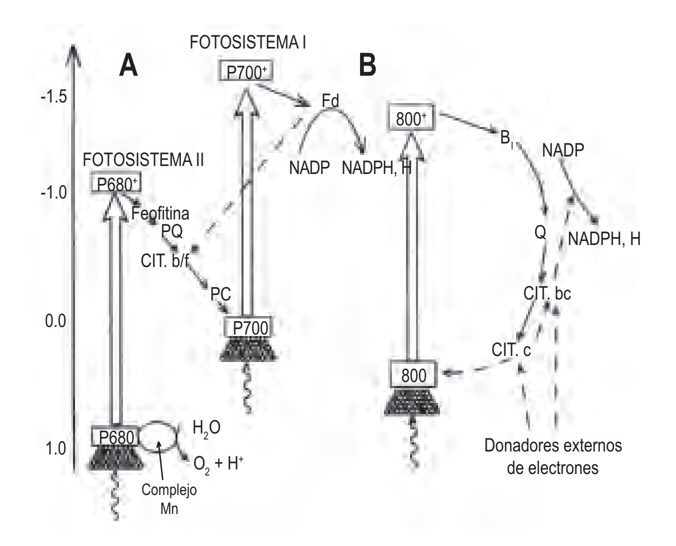


Figura 11– Esquemas de las fotosíntesis oxigénica (A) y de la anoxigénica (B)

Las figura 11 esquematiza el flujo de electrones en ambos tipos de fotosíntesis, la 12 (Madigan *et al*., 2000) y la 13 (Prescott *et al*.. 1999), muestran las estructuras celulares que albergan a los pigmentos fotosintéticos y pigmentos accesorios en células procariotas y eucariotas.

Membrana fotositética en láminas (bacterias purpúreas)

Membranas y vesículas individuales (clorobio) (bacterias purpúreas)

Clorosomas unidos a la membrana plasmática (bacterias verdes)

Bacterioclorofila asociada directamente a la membrana plasmática

Figura 12- Localización de pigmentos fotosintéticos en procariotas

En el cuadro 25 se comparan ambos tipos de procesos.

Cuadro 25- Energía y poder reductor en ambas fotosíntesis

Poder reductor	C	energía
	anoxigénica	
H_2S ↓ S^o ↓ $SO_4^=$	CO_2 ↓ $(CH_2O)_n$	ADP ↓ ‹ hv ATP
	oxigénica	
H_2O hv › ↓ $^1/_2O_2$	CO_2 ↓ $(CH_2O)_n$	ADP ↓ ‹ hv ATP

La figura 14 (Madigan *et al*., 2000) muestra la composición y espectro de absorción de la clorofila a, típica de los eucariotas, la bacterioclorofila, de los procariotas. Se observa el mayor espectro de absorción en las bacterioclorofilas, que absorben además en la región azul del espectro, luz de longitud de onda larga, cerca de 1000nm, no visible al ojo humano (zona oscura, en pantanos, suelos anegados).

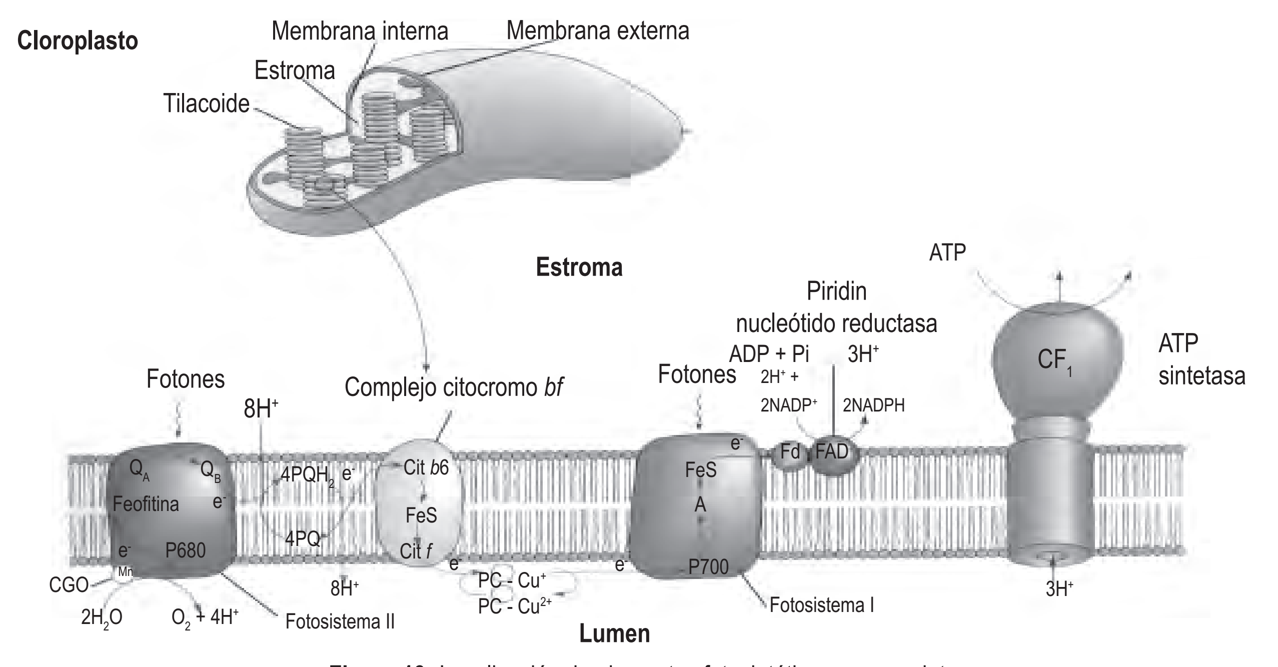


Figura 13- Localización de pigmentos fotosintéticos en eucariotas

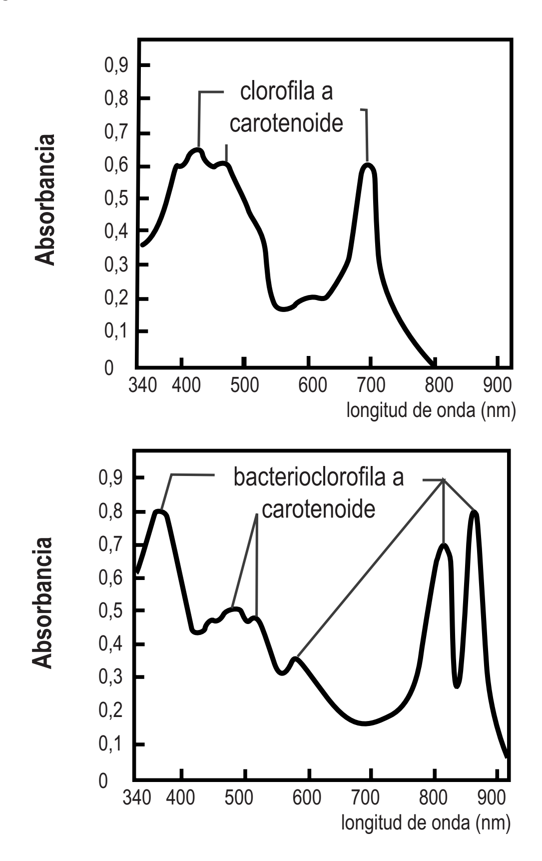


Figura 14- Espectro de absorción de la clorofila y de la bacterioclorofila.

Cuadro 26- Bacterias fotosintéticas anoxigénicas
Anoxyphotobacteria

Purpúreas no sulfurosas	Flia I	*Rhodospirillaceae* gén. *Rhodospirillum*
Purpúreas sulfurosas	Flia II	*Chromatiaceae* gén. *Chromatium*
Verdes sulfurosas	Flia III	*Chlorobiaceae* gén. *Chloorobium*

A modo de resumen el cuadro 26 se analizan los principales géneros de bacterias fotosintéticas anoxigénicas, en el 27 se resumen los procesos generales de la fotosíntesis y en el 28 se comparan las propiedades de los sistemas fotosintéticos encontrados en microorganismos.

Antes de lograr su aislamiento en cultivo puro, Winogradsky puso en evidencia procesos anaerobios fotosintéticos en el suelo enriqueciendo poblaciones escasas de ellas en una columna de vidrio, que se puede reproducir en cualquier laboratorio. Se colocan barros o sedimentos de estanques o lagos (inóculo), con una fuente de materia orgánica (papel, almidón, azúcares, etc.), sulfato de sodio y anaerobiosis. Al cabo de un tiempo con luz indirecta, se aprecian colores que evidencian el enriquecimiento logrado (figura 15). Actúan primero bacterias sulfatorreductoras heterótrofas que liberan sulfuros que reaccionan con el hierro del suelo dando precipitado negro de sulfuro ferroso.

Parte del sulfuro soluble es fuente de donadores externos de electrones para las bacterias fotosintéticas, pigmentadas de verde y rojo (bacterias verdes y purpúreas). Arriba se desarrollan algas.

El aislamiento puede lograrse tomando muestras en la columna con una pipeta, a la altura de los colores típicos y sembrando en cajas de Petri cerradas y a la luz, a los efectos de obtener colonias aisladas.



Figura 15- Columna de Winogradsky.
Manchas negras de sulfuro ferroso, bacterias fotosintéticas: sulfurosas purpúreas y verdes y en la parte superior se desarrollan algas.

Cuadro 27- Ecuaciones generales de fotosíntesis

oxigénica

algas, cianobacterias

$CO_2 + 2H_2O \longrightarrow (CH_2O)_n + H_2O + O_2$

anoxigénica

$CO_2 + H_2S \longrightarrow (CH_2O)_n + S^o$

bact. sulfurosas purpúreas y verdes (Chomatiaceae y Chlorobiaceae)

$CO_2 + CH_3COOH \longrightarrow (CH_2O)_n + H_2O$

bact. no sulfurosas *(Rhodospirillaceae)*

$CH_3COOH \longrightarrow (CH_2O)_n + H_2O$

integrantes de *Rhodospirillaceae*

fase oscura:

$6CO_2 + 18\ ATP + 12NADPH \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 18ADP + Pi + 12NADP^+$

Cuadro 28- Propiedades de los sistemas fotosintéticos microbianos

Propiedad	**eucariotas**	**cianobacterias**	**bacterias verdes y purpúreas**
Pigmento fotosintético	clorofila a	clorofila a	bacterioclorofila
Fotosistema II	presente	presente	ausente
Donadores de electrones	H_2O	H_2O	H_2, H_2S, S^o, comp.orgánicos
Producción O_2	oxigénica	oxigénica	anoxigénica
Productos primarios de la conversión de energía	ATP, NADPH	ATP, NADPH	ATP
Fuente de carbono	CO_2	CO_2	Compuestos orgánicos y/o CO_2

Resumen final: el cuadro 29 vincula la clasificación nutricional de los microorganismos con los posibles mecanismos de obtención de energía y cita ejemplos de cada grupo.

Cuadro 29 - Clasificación nutricional de los microorganismos

Fuente de energía:

Luz (fototrofos)

Reacciones químicas (quimiotrofos)

Carbono: CO_2 (autótrofos)
orgánico (heterótrofo)

Donadores de e^-: inorgánico (litotrofo)
orgánico (organotrofo)

Electromagnética: **FOTOTROFOS**

Fotoautolitotrofos

* Bacterias sulfurosas purpúreas y verdes
(Chromatiaceae y Chlorobiaceae)

$CO_2 + H_2S \longrightarrow (CH_2O)n + S^o + H_2O$

* cianobacterias

$CO_2 + 2H_2O \longrightarrow (CH_2O)n + O_2 + H_2O$

Fotoautoorganotrofo

* Bacterias no sulfurosas purpúreas
(*Rhodospirillaceae)*

$CO_2 + CH_3COOH \longrightarrow (CH_2O)n + H_2O$

Fotoheteroorganotrofo

* Bacterias no sulfurosas

$CH_3COOH \longrightarrow (CH_2O)n + H_2O$

No pueden reducir el CO_2

Reacciones químicas: **QUIMIOTROFOS**

Quimioautolitotrofo
Bacterias: aerobias

oxidantes del amonio:
$NH_4^+ \ 1,5\ O_2 \longrightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O$

oxidantes del nitrito:
$NO_2^- + 0,5O_2 \longrightarrow NO_3^-$

oxidantes del azufre:
$S^o + 1,5O_2 \longrightarrow H_2SO_4 + H_2 0$
$S_2O_3^{=} + 4O_2 \longrightarrow H_2SO_4 + H_2O$

oxidantes del hierro:
$Fe^{++} + O_2 \longrightarrow Fe^{+++} + H_2O$

oxidantes del hidrógeno:
$H_2 + O_2 \longrightarrow H_2O$

Bacterias anaerobias:
$SH_2 + NO_3^- \longrightarrow SO_4^{=} + N_2$

Quimioheteroorganotrofo
La mayoría de las bacterias, todos los hongos, protozoos

Respiraciones aerobios
$C_6H_{12}O_6 + O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$

Respiraciones anaerobias
$C_6H_{12}O_6 + NO_3^- \longrightarrow CO_2 + H_2O + N_2$

Aceptores de electrones:
Nitrato: desnitrificantes
Sulfato: sulfatorreducción

$C_6H_{12}O_6 + SO_4^{=} \longrightarrow CO_2 + H_2 0 + H_2S$

Hierro: reducción del Fe^{+++}

CO_2/carbonatos: metanogénesis
$H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4 + H_2O$

Fermentaciones:
Donadores y aceptores de e^-: moléculas orgánicas (bacterias, hongos)
Fermentación láctica
$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CHOHCOOH$

Grupo pequeño, gran especificidad por el sustrato, bajo rendimiento energético, por respiraciones aerobias y anaerobias con sustrato inorgánico.
Crecimiento lento. Productos importantes para las plantas.

La mayoría de los microorganismos de la naturaleza.
Los más eficientes: respiraciones aerobias con sustratos orgánicos

Bibliografía

Madigan, Martinko y Parker, **Brock, Biología de los microorganismos**, 9ª edición, 2000, Prentice Hall International

Prescott, Harley, Klein **Microbiología,** 1999 McGraw-Hill.Interamericana

Preguntas de repaso

1) Cite 3 grupos de bacterias fotoautótrofas y 3 quimiautótrofas que habiten el suelo y explique las diferencias entre ambos grupos. Anote y diferencie la forma por la cual ellas obtienen carbono y energía.
2) Señale los tipos metabólicos por los cuales obtienen energía los siguientes microorganismos: aerobios obligados, anaerobios obligados, anaerobios facultativos y anaerobios aerotolerantes
3) Por qué las respiraciones aerobias con sustrato inorgánico rinden menos energía que las con sustrato orgánico?
4) Señale alguna respiración aerobia incompleta de gran valor biotecnológico
5) Por qué se considera que las fermentaciones son procesos muy antiguos
6) La aparición de que elemento cambió las formas de obtención de energía?
7) Por qué se dice que las bacterias fotosintéticas anaerobias pueden crecer en zonas donde aparentemente no hay luz visible?
8) Qué importancia ecológica tienen estas bacterias?
9) Compare la estructura y la función fotosintética de: cianobacterias y bacterias sulfurosas purpúreas y verdes?
10) Analice la sucesión microbiana en la llamada columna de Winogradsky. Cómo aislaría en cultivo puro a los diferentes grupos?

4 Crecimiento microbiano y su control

El crecimiento en sentido biológico implica un aumento ordenado de todos los componentes celulares y no sólo de alguno de ellos. En este sentido el concepto es más estrecho que el término desarrollo. Una bacteria puede acumular polisacáridos y aumentar su peso, sin que por ello esté creciendo. En poblaciones de organismos unicelulares, como son el caso de la mayoría de las bacterias, algas unicelulares, protozoos y esporas de hongos, el crecimiento trae aparejado la división celular y el aumento del número de células por unidad de volumen.

La figura 1 presenta los eventos en la división binaria de una célula procariota: duplicación del ADN y de todos los componentes celulares, formación del tabique o septo dirigido por la membrana celular, con formación de dos células hijas idénticas (clon).

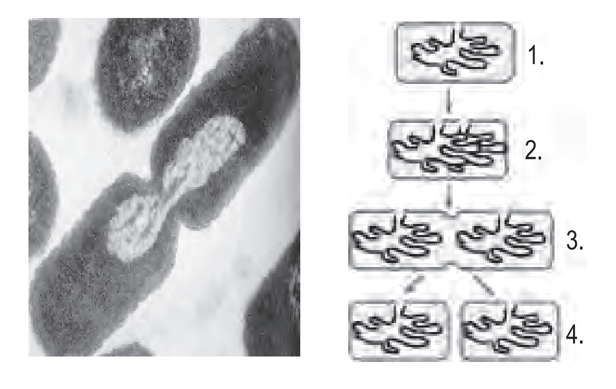


Figura 1- División binaria de microorganismos unicelulares (bacilo)

El crecimiento de los microorganismos en la naturaleza es mucho más lento que en el laboratorio bajo condiciones óptimas por la carencia de nutrientes y por las condiciones ambientales, no siempre favorables ni constantes.

En la naturaleza los microorganismos se encuentran libres en la solución del suelo y usualmente existen en ***biofilms**:* grupos de diferentes microorganismos organizados en capas e inmovilizados en la superficie de un sustrato, rodeados en general por una matriz de polímeros orgánicos de origen microbiano. Se desarrollan prácticamente en todas las superficies inmersas en ambientes acuosos naturales, biológicos, como en los vegetales, como abióticos, como plásticos, piedras, partículas del suelo. Allí, las interacciones son numerosas tanto sinérgicas como antagónicas (capítulo 14).

En el laboratorio, los organismos son estudiados como cultivos puros, en medios y condiciones de cultivo adecuadas. Analizaremos la cinética del crecimiento en el laboratorio (*in-vitro*).

Crecimiento exponencial

Es aquel en que todas las células se dividen al mismo tiempo, en forma sincrónica, duplicando la población en cada unidad de tiempo conocido como tiempo de generación. Se postula que en esta fase todas las células son viables y que la población no envejece.

Algunos conceptos:

Velocidad de crecimiento: Es el número de generaciones (divisiones) que ocurren por unidad de tiempo y se expresa en generaciones por hora.

$$\mathbf{Vc = \Delta n / \Delta t}$$

Tiempo de generación: Es el tiempo requerido para que a partir de una célula se formen dos, o sea el tiempo requerido para duplicar el número de células de una población. Se expresa en horas/generación y en *E. coli* puede se de 20 minutos (3 generaciones/h).

tg=1/vc

Analizaremos el caso hipotético de un organismo unicelular, bacteria, protozoo, alga, que comience a dividirse en forma exponencial en un medio de cultivo líquido adecuado. Calcularemos el número de generaciones, el número final de células/mL a medida que transcurre el tiempo (cuadro 1).

Cuadro 1- Crecimiento exponencial (logarítmico) en una bacteria

Nº de células/mL	Tiempo (h)	Nº generaciones	$\log_2$ Nºcel/mL	$\log_{10}$ Nºcel/mL
1	0	0	0	0,000
2	0,5	1	1	0,301
4	1	2	2	0,602
8	1,5	3	3	0.903
16	2	4	4	1,204
32	2,5	5	5	1,505
Nf (número final)	t (tiempo)	n generaciones	$n = \log_2$ Nºcél./mL	$n = \frac{\log_{10} \text{Nºcel./mL}}{0,301}$

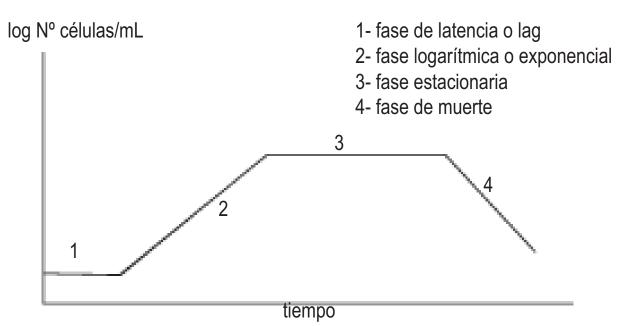


Figura 2- Crecimiento de un microorganismo en medio líquido de volumen fijo (*batch*)

Analizando los eventos en la división celular del cuadro 1, podemos deducir que la ecuación que representa el número final de células por unidad de volumen es:

$$Nf = No.2^n$$

N_o= número inicial de células/mL N_f= número final de células/mL
n = número de generaciones $n = \log_2 Nf - \log_2 No$

Vemos que la diferencia entre los logaritmos en base 2 del Nº de células/mL es igual al número de generaciones transcurridas en el tiempo analizado (ecuación y cuadro 1).

Como usamos más los logaritmos en base 10, en lugar de los de base 2 tenemos:

$$n = \frac{\log_{10} Nf - \log_{10} N_0}{\log_{10} 2 = 0,301}$$

La velocidad de crecimiento expresa la eficiencia en la utilización de los sustratos y el efecto de los factores ambientales.

El crecimiento de células viables (capaces de reproducirse en un medio adecuado) se expresa en escala semilogarítmica (número de células/mL en logaritmo y el tiempo en escala aritmética) ya que resulta imposible graficar el crecimiento de organismos unicelulares en escala aritmética (al cabo de unas horas pueden alcanzar densidades muy elevadas: 10^8-10^{10} células/mL).

NOTA: i) Para verificar este hecho calcule el peso de células bacterianas luego de 24 horas de crecimiento exponencial, partiendo de una célula cuyo peso es un picogramo (10^{-12}g) y cuyo tiempo de generación es de 1 hora.
ii) ¿Por qué el crecimiento se detiene en la naturaleza y su representación sigue una curva sigmoide?

La figura 2 muestra los eventos que pueden darse cuando un microorganismo unicelular se introduce en un medio líquido adecuado a su crecimiento. Se aprecian 4 fases, desde el inicio del cultivo (inoculación, tiempo cero) hasta la muerte de la mayoría de las células (esterilización del cultivo).

Las características de las distintas fases son:

Fase de latencia o fase lag no hay división celular, las células se adaptan al medio, aumenta el nivel de coenzimas necesarias para el funcionamiento de enzimas. Esta fase debe acortarse en el laboratorio y en la industria, porque implica gasto de energía y tiempo. Esto se logra repicando el cultivo a un medio de la misma composición que el de origen, introduciendo un inóculo grande (en general un 10% del volumen final del nuevo medio) y sembrando con cultivos jóvenes.

La edad del inóculo es el tiempo transcurrido entre la siembra en el medio de origen y el repique (ejemplo de 6, 12 horas).

Fase exponencial o logarítmica (log), en esta etapa se logra el mayor crecimiento, la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación mínimo. Se postula que en esta etapa cada célula es capaz de dividirse, por lo que todas las células están viables. En la industria interesa trabajar en esta fase y por ello se realizan cultivos continuos (figura 3) (Prescott *et al.*, 1999) donde la concentración de una sustancia limitante del crecimiento, por ejemplo una vitamina, es incorporada al medio de modo de lograr una velocidad de crecimiento constante y máxima por mucho tiempo.

Los **cultivos continuos** se caracterizan por:

i) Suministrar igual cantidad de medio fresco que el removido del sistema
ii) La concentración de nutrientes limitantes controla la densidad celular
iii) La tasa de dilución controla la tasa de crecimiento
iv) Si el cultivo es cuidadosamente controlado puede ser mantenido indefinidamente

Fase estacionaria por diversos motivos el crecimiento en la naturaleza se detiene, en general por falta de nutrientes y/o por acumulación de sustancias inhibidoras o tóxicas productos del propio metabolismo celular. El caso más típico es la detención del crecimiento de bacterias lácticas debido a la producción de ácido láctico en la fermentación, que inhibe a las células, que son neutrófilas.

En esta etapa pueden darse dos situaciones:
Que las células dejan de dividirse en su conjunto, **vc=0**, puede ser el caso de la acumulación de productos tóxicos.

Que la **vc=vm,** o sea, la velocidad resultante es estadísticamente cero, pero hay células que se dividen aun, pero muere la misma cantidad, en el mismo periodo de tiempo

Fase de muerte, domina la velocidad de muerte (negativa) sobre la de crecimiento. El cultivo puede llegar a esterilizarse, o bien puede esporular y conservarse en estado cripto biótico.

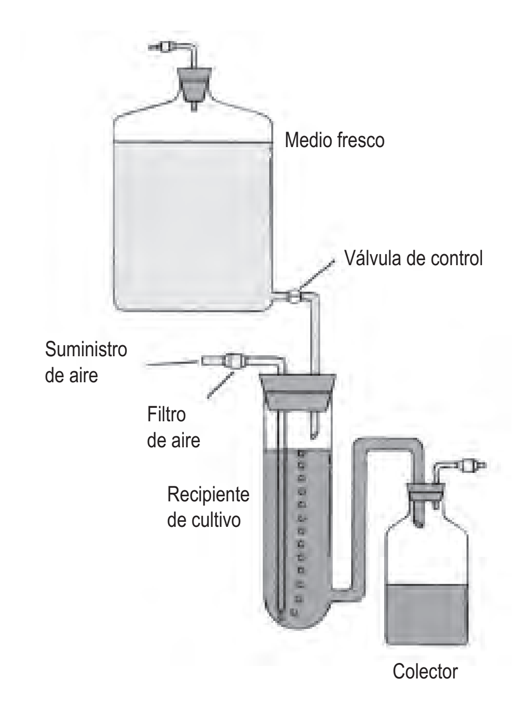


Figura 3- Cultivo continuo (quimiostato)

Evaluación de crecimiento

Analizaremos los distintos procedimientos para medir el crecimiento (cuadro 2).

Recuentos microbianos

Recuento de microorganismos totales en cámaras

Fundamento del método: una muestra de cultivo bacteriano diluido se coloca en una cámara de volumen pequeño y conocido, como por ejemplo la de Petroff-Hause que encierra $2,5x10^{-7}$ mL y se cuentan al microscopio las células contenidas en numerosos cuadrados de la cámara (figura 4) (Prescott *et al.*, 1999).

Se calcula el promedio de células contenidas en dicho volumen y se expresa el Nº células/mL de la muestra. La desventaja es que no se pueden distinguir células viables de no viables y el error experimental es alto. Pero se pueden efectuar numerosas determinaciones en poco tiempo, con solo lavar la cámara y volverla a cargar.

Cuadro 2- Evaluación del crecimiento

1- Determinación del número de microorganismos: recuentos
Métodos directos: recuento total
Recuento microscópico directo (cámaras de recuento)
Conteo electrónico (cada célula origina una corriente eléctrica)
Métodos indirectos: recuentos de viables
Recuentos en placa (cada célula origina una colonia)
Filtración por membrana e incubación del filtro en caja de Petri
2- Determinación de la masa celular
Métodos directos
Medida de la masa
Medida del volumen
Métodos indirectos
Determinación del contenido de N, C, P, etc.
Turbidimetría (determinación de la densidad óptica de los cultivos)
3- Determinación de la actividad celular
Actividad enzimática (deshidrogenasas, fosfatasas, etc.)
Concentración de un metabolito (C, N, S, etc.)
Medida de la respiración (evolución del CO_2 o consumo de O_2)

Este tipo de recuento es muy empleado cuando se desea conocer el nivel de crecimiento de cultivos conocidos, en el laboratorio o en la industria que se encuentren en fase logarítmica, en forma rápida.

Método indirecto- Recuento de viables en placa

El **fundamento** del método es permitir el crecimiento de una sola célula en la superficie de un medio de cultivo sólido apropiado. Se postula que cada colonia proviene de una sola célula y teniendo en cuenta el volumen de inóculo empleado y la suspensión-dilución sembrada (figura 5) se calcula el Nº de unidades formadoras de colonias **(ufc)/mL)** o por gramo en caso de muestras sólidas (suelo, alimentos, etc.).

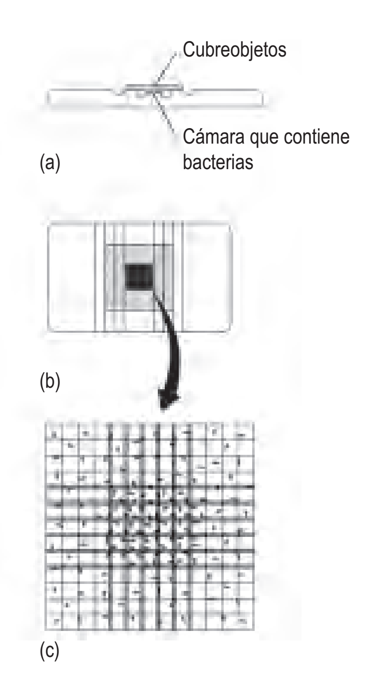


Figura 4- Cámara de recuento de Petroff-Hause

Ventajas: es el único procedimiento correcto, ya que cada unidad formadora de colonia (célula, trozo de micelio, espora) da origen a una colonia.

Desventajas: es más lento, no existe un medio de cultivo para desarrollar a todos los microorganismos presentes en una muestra. Resulta muy útil en la evaluación de grupos fisiológicos: microorganismos que pueden no estar relacionados taxonómicamente, pero que realizan una función metabólica común. Por ejemplo: fijadores aerobios de nitrógeno, celulolíticos anaerobios, nitrificantes, etc.

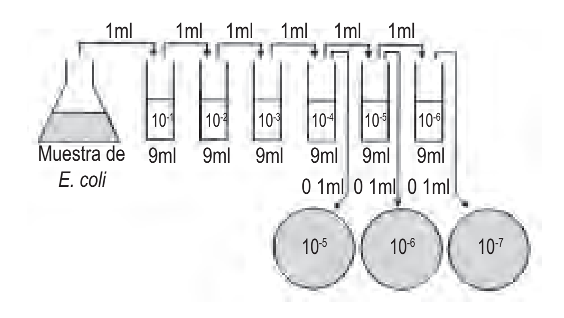


Figura 5- Preparación de suspensiones-diluciones de un cultivo bacteriano

Procedimiento: consiste en contar el número de colonias formadas en medio de cultivo sólido adecuado, luego de sembrar volúmenes conocidos de varias suspensiones-diluciones de la muestra (suelo, aguas, alimentos). La siembra con varias repeticiones permite disminuir el error experimental, el cual es alto en esta técnica. El método selecciona las cajas de Petri con entre 30 y 300 colonias (figura 6), ya que más de 300 colonias por caja implica que muchas pueden originarse por más de una célula dada su alta densidad y las de menos de 30 colonias también presentan gran error.

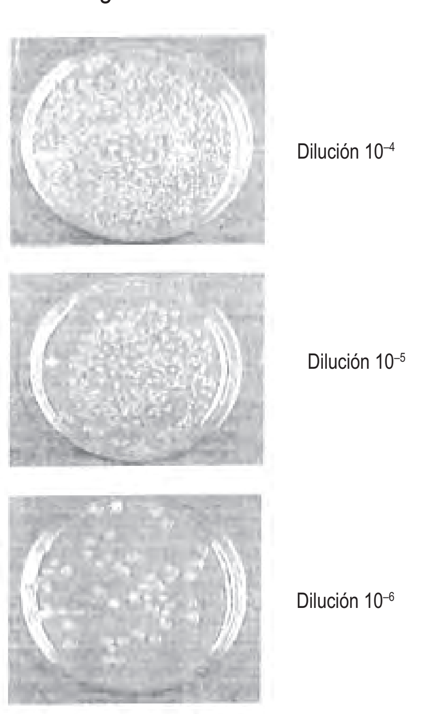


Figura 6- Recuento de viables en medio sólido

Recuento en aguas: la figura 7 (Prescott *et al.*, 1999) muestra el procedimiento seguido para el recuento de viables, por ejemplo coliformes en aguas, las que deben ser filtradas (por ejemplo 100 mL de agua) a los efectos de concentrar la carga microbiana, por filtros bacteriológicos (0,45 micras), los que luego se depositan en la superficie de medios adecuados. Muchas veces los filtros están cuadriculados, lo que facilita el recuento de las colonias formadas.

Expresión de los resultados

Nº de ufc/mL= (promedio de colonias en 3 o más repeticiones) X 1/dilución X 1/inóculo

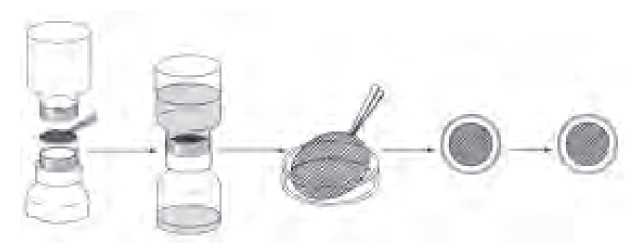


Figura 7- Recuento de viables en medio sólido previa filtración de muestras líquidas (aguas)

Ejemplo:
Nº de colonias en la suspensión dilución 10^{-5} = 65, 68, 77;
inóculo/caja = 100μL
Nº ufc/mL = 70 X 10^5 X 10 = 7,0 X 10^7.
En muchos casos se expresa en logaritmo en base 10: $\log_{10}$ Nº ufc/mL = 7, 84

Recuento de viables en medio líquido (Número más probable = NMP)

Se basa en la siembra (1mL, por ejemplo) de 3 o 5 tubos por cada suspensión-dilución de la muestra en estudio, con medio adecuado para el grupo fisiológico analizado (celulolíticos, fijadores de N_2, amonificantes, etc.). Se efectúan 3 repeticiones del recuento completo (figura 8).

Luego de un período adecuado de incubación se leen los tubos positivos (crecimiento por: turbidez y/o aparición o desaparición de una sustancia, evaluada químicamente) en tres diluciones consecutivas.

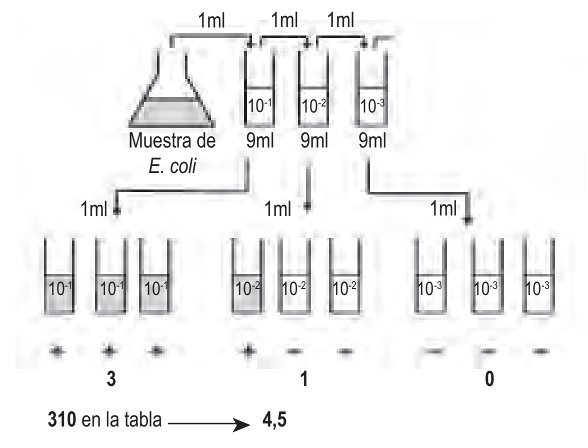


Figura 8- Esquema de un recuento de viables en medio líquido (NMP)

Se forma así el número característico = Nº característico, de 3 cifras, con el cual se entra en tablas como la de Mc Crady (Anexo práctico), que da el NMP en un mL de la primera de las tres diluciones del Nº característico.

Ejemplo de recuento: se sembraron 0,1 mL. de suspensiones-diluciones de una muestra de leche en medio líquido adecuado (3 tubos/dilución). Los resultados fueron:

Suspensión/dilución	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Tubos positivos	+++	+++	++-	- - -
con crecimiento	+++	+++	+++	- - -
	+++	+++	+ - -	- - -

Lectura: Nº característico: 320, 330 y 310 (dilución 10^{-4}) en las 3 repeticiones **NMP** (tabla) 9,5, 25,0 y 4,5 respectivamente, para 0,1 mL de inóculo de la misma dilución (se promedian)

Recuento de microorganismos lácticos viables= 13,0 x 10 (para pasar a 1mL) x 10^4 = 1,3 x 10^6/ mL de muestra original

Constituye un método indirecto, ya que la tabla se construyó realizando el recuento de viables en medio sólido de algunas combinaciones y luego por computadora se calculan los puntos no determinados. Es muy empleado en recuentos de coliformes en aguas y de muchos grupos fisiológicos en suelos. No requiere el manipuleo de cajas de Petri.

Recuento de viables en plantas

Se aprovecha alguna propiedad de los microorganismos, como la formación de nódulos, producción de alguna enfermedad en vegetales. Se siembran las suspensiones diluciones de la muestra en tubos o macetas con las plántulas elegidas (leguminosas, por ejemplo). La aparición de nódulos indicará que al menos una célula ha sido inoculada en ese tubo o maceta. Tablas adecuadas permiten calcular el NMP. Este recuento se explica en el Anexo práctico.

Otros métodos

Muy empleado es el método de evaluación del crecimiento por determinación de la masa celular en forma indirecta, por la **turbidez de los cultivos** en función del tiempo. Se evalúa la densidad óptica a unos 600nm en espectrofotómetro. La misma es proporcional a la concentración, dentro de ciertos límites y esta técnica es muy empleada en la rutina del laboratorio. Requiere de una determinación previa que relaciona densidad óptica frente a recuentos microbianos, efectuados en medio sólido en placas.

Los otros métodos de evaluación del crecimiento emplean propiedades bioquímicas y metabólicas como son las determinaciones de alguna enzima, actividad respiratoria, contenidos de C, N. etc., muchos de ellos pueden encontrarse en el Apéndice práctico.

Preguntas de repaso

1) Una población de bacterias pasó de 2.10^3 a 5.10^8 células /mL en 10 horas. Calcule el número de generaciones, la velocidad de crecimiento, y el tiempo de generación.
2) Determine el número total de células presentes por mL en una muestra de levaduras usando la cámara de Neubauer o similares, cuyo cuadrado grande está dividido en 25 medianos y cada uno en 16 chicos. Datos de éstos últimos:
   A = 0,0025mm^2, h = 0,1 mm
   Resultados: n° de células/ cuadrado chico: 18, 32,45, 88,68, 19, 46, 69, 70
3) Concepto de crecimiento exponencial
4) ¿Por qué éste no puede mantenerse indefinidamente en la naturaleza?
5) ¿Y en el laboratorio puede mantenerse?
6) Diferencias entre métodos de recuento directo (células totales) e indirectos (células viables)
7) Ventajas y limitaciones principales de los métodos de recuentos de viables en medio sólido
8) Fundamento y aplicación del recuento de viables en medio líquido (NMP)
9) Cuando se va a construir la curva de crecimiento de un microorganismo en un medio adecuado, ¿se usan recuentos de viables o de totales?
10) ¿En qué etapas de la curva puede emplear indistintamente ambos métodos de recuentos?

11) Analice las causas de divergencias en otras etapas de la curva. Calcule el número de coliformes en una muestra de aguas en medio de cultivo líquido adecuado para este grupo (3 repeticiones, siembra =1 mL en cada uno de tres tubos/dilución).

Suspensión/dilución	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
crecimiento (+)	+++	+++	+++	++-	- - -
negativo (-)	+++	+++	+++	+- -	- - -
	+++	+++	+++	- - -	- - -

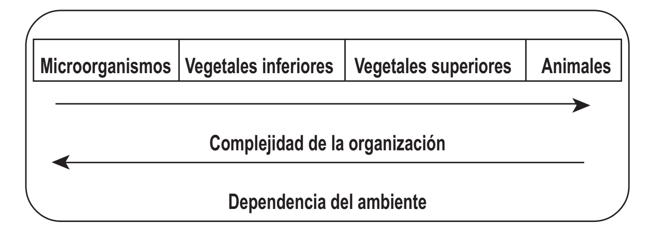
¿Qué piensa de la calidad de este producto?

10) Fundamento de los métodos que evalúan densidades ópticas de los cultivos

Efecto del ambiente sobre los microorganismos

Los microorganismos están muy distribuidos en la naturaleza, en ambientes tan variables como los suelos, aguas, aire, superficie de vegetales, en animales e incluso en el hombre. El carácter mayoritariamente unicelular o muy simple de los microorganismos los hace muy vulnerables a cambios en el ambiente (cuadro 3):

Cuadro 3- Relaciones entre organismos y el ambiente



Se aprecia una relación inversa entre complejidad de la organización de los distintos organismos y su dependencia con el ambiente. En los microorganismos toda su superficie celular está en contacto con el ambiente y cambios muy marcados en factores como la temperatura, acidez, presión osmótica, concentración de sustancias químicas, pueden detener procesos microbianos. Si los microorganismos pueden esporular, lo harán en condiciones adversas, otras veces su número decae marcadamente.

Por comodidad los **factores del ambiente** se dividen en:

- **físicos,** como la temperatura, gases, presión osmótica, pH
- **químicos,** o físico-químicos: nutrientes, sustancias antimicrobianas
- **biológicos**, otros organismos: microorganismos, micro y mesofauna, la vegetación, afectan también las actividades microbianas.

Las interacciones biológicas de microorganismos entre si, con animales (rumen) y con las plantas, son analizadas en los capítulos 13 al 18.

Los distintos factores actúan simultáneamente y resulta difícil el estudio integrado de los efectos. En general, se varía uno de los factores, por ejemplo la temperatura de incubación y se dejan los restantes factores a niveles constantes y óptimos. Se evalúa el crecimiento del microorganismo en estudio determinando su velocidad de crecimiento, tiempo de generación o la cosecha máxima (log Nº de células a las que llega con y sin la incidencia del factor en estudio). Muchas veces se aprecian fracasos en aislamientos de organismos debido a pequeñas variaciones en los niveles de nutrientes o en las condiciones de cultivo.

La comprensión de cómo los factores ambientales afectan el crecimiento microbiano permite interpretar la distribución de los mismos en la naturaleza y diseñar métodos de control del desarrollo microbiano y destruir organismos indeseados.

Efecto de algunos factores del ambiente

Físicos y físico-químicos

- Temperatura
- Oxígeno y otros gases
- pH
- Presión osmótica
- Radiaciones

Temperatura: los microorganismos se encuentran en casi todos los ambientes, incluso los muy extremos y cada uno presenta un rango de temperatura de crecimiento, con una temperatura mínima, debajo de la cual no se evidencia el crecimiento, una óptima, donde este es máximo y una máxima, por encima de la cual el crecimiento cesa (figura 9) (Madigan *et al.*, 2000).

Según los rangos de temperatura en que pueden desarrollarse los distintos grupos microbianos, se los clasifica en sicrófilos, mesófilos y termófilos (cuadro 4).

Cuadro 4- Rangos de temperatura en microorganismos

Tipos	Rango de temperatura	Óptimo
sicrófilos	0-20ºC	15ºC
mesófilos	15-45ºC	35ºC
termófilos	40-70ºC	55ºC

La mayoría de los habitantes de los ecosistemas naturales son **mesófilos**, incluidos los patógenos de animales y el hombre. Se encuentran sicrófilos sobre glaciales, suelos congelados, a los que colorean con sus pigmentos y son sobre todo algas y cianobacterias. La mayoría de los microorganismos activos en suelos en períodos fríos del invierno se consideran mesófilos resistentes al frío, más que verdaderos sicrófilos. Algunos hongos se desarrollan en heladeras (5ºC) donde deterioran alimentos (cuadro 5).

Los **termófilos** son los más activos metabólicamente, sabemos que las reacciones químicas duplican su velocidad por cada aumento de 10ºC de la temperatura, hasta un valor en que se desnaturalizan macromoléculas importantes, como ácidos nucleicos, proteínas, etc.

La figura 9 muestra el efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano. La curva no es simétrica precisamente por la desnaturalización rápida que ocurre no bien se excede la temperatura óptima de crecimiento. Los termófilos son responsables de importantes procesos microbianos en pilas de restos orgánicos, en el compostaje, etc., donde la temperatura se eleva localmente (capítulo 21).

Las **bajas temperaturas** se emplean para **conservar** alimentos, microorganismos, etc. Estos se mezclan con una sustancia que baja el punto de congelamiento, como el glicerol (30-50% en volumen) a los efectos de no inducir lesiones en las membranas por |os cristales de hielo formados y se conservan en pequeños tubos a -70ºC.

Cuadro 5- Clasificación de los microorganismos según la temperatura

- **Sicrófilos**: microorganismos capaces de crecer a bajas temperaturas
  rango: 0 -20°C, óptimo < 15°C
  - organismos marinos, algas: *Chlamydomonas nivalis* (nieve rosada), bacterias: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*
  - la membrana contiene alto % de ácidos grasos insaturados
- **Sicrótrofos o sicrófilos facultativos**
  rango: 0-35°C, óptimo 20-30°C
  - *Pseudomonas* - crecen en el refrigerador
- **Mesófilos** rango: 15-45° C, óptimo: 30-40°C
  la mayoría de los microorganismos (del suelo, aguas, patógenos)
- **Termófilos:** microorganismos capaces de crecer a temperaturas superiores a 45ºC.
  rango: 40-70°C, óptimo de 55-65°C
  - membrana contiene alto % de ácidos grasos saturados
  - enzimas estables al calor
  - *Bacillus stearothermophilus*, organismos del compostaje
  En la naturaleza hay pocos ambientes con temperaturas tan elevadas
- **Hipertermófilos** rango: 80-113°C, óptimo > 90°C
  - *Pyrococcus, Pyrodictium* (aguas termales)

Las **altas temperaturas** se usan para **esterilizar**. La destrucción de los microorganismos por el calor se realiza por calor seco (estufas) o calor húmedo (autoclaves).

pH

Si bien el pH interno de las células es neutro, los microorganismos poseen mecanismos de control de entrada y salida de protones y cationes a nivel de la membrana y pueden desarrollarse en amplios rangos de concentración hidrogeniónica (cuadro 6).

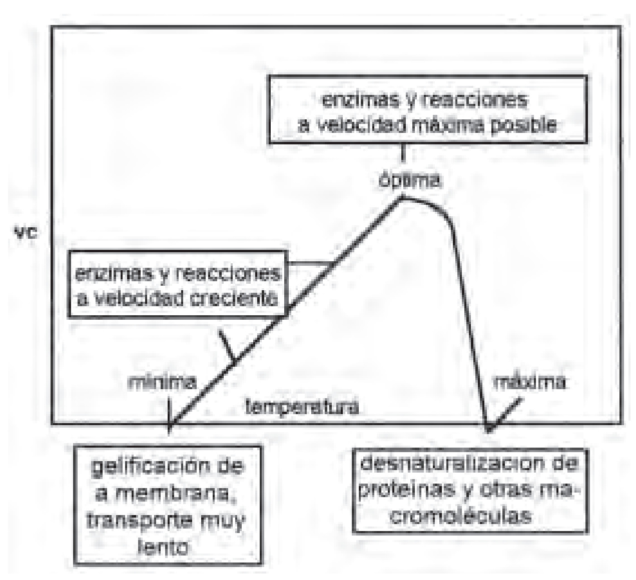


Figura 9- Efecto de la temperatura sobre el crecimiento microbiano (vc = velocidad de crecimiento)

Cuadro 6- Efecto del pH sobre los microorganismos

Tipos	rango de pH	óptimo
acidófilos	0 -7	5
neutrófilos	5 -12	7
basófilos	9 -14	10

En ambientes de pH bajo dominan bacterias fermentativas, como las lácticas, las anaerobias y hongos, que si bien son neutrófilos como grupo, se favorecen en ambientes ácidos por falta de competencia de las bacterias. Los medios de cultivo se acidifican con ácidos orgánicos, láctico, acético, ya que penetran en la célula sin disociarse y dentro liberan los protones que alteran el pH interno de las células, más eficientemente que los ácidos inorgánicos, disociados.

Por el efecto sobre el **pH del ambiente** se distinguen micoorganismos:

- **acidófilos**: bajan el pH de restos vegetales en los silos, de suelos, en la leche, por producción de ácidos (láctico, etc.) o consumo de álcalis, como el amonio
- **alcalinizantes:** suben el pH del ambiente por consumo de ácidos (deterioro de los silos al descender el ácido láctico), o por liberación de bases, como aminas, amonio.

Para mantener el crecimiento de los microorganismos se agregan a los medios o bien sustancias con carácter ácido o alcalino (carbonato de calcio; ácidos orgánicos) o pares de sustancias con carácter tampón (*buffers*), como el par fosfato: K_2HPO_4 y KH_2PO_4 (figura 10). Estas sustancias permiten el crecimiento durante más tiempo y resultan imprescindibles en la industria, donde se requiere llegar a altos números de células por mL.

Presión osmótica

Los microorganismos deben desarrollarse en medios con adecuadas concentraciones de solutos. Si ésta no se controla, los organismos no se desarrollan e incluso se llega a la lisis celular. La figura 11 muestra el efecto de la concentración de solutos y el cuadro 7 presenta la clasificación de los microorganismos según su adaptación a ambientes con distinta actividad de agua.

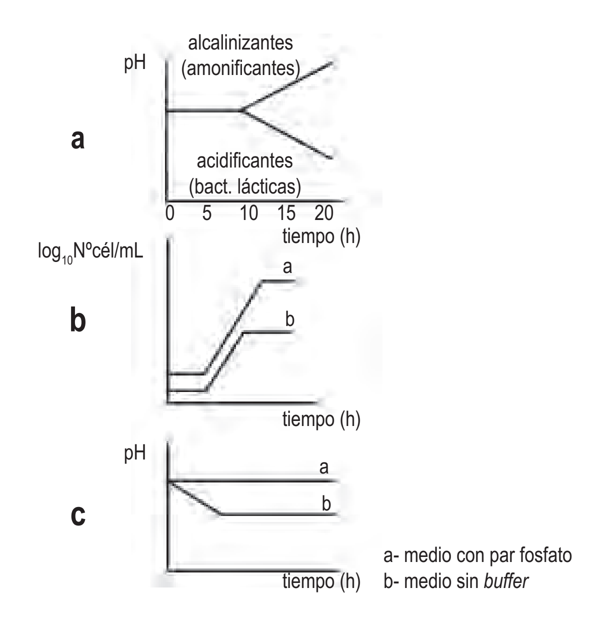


Figura 10- Clasificación de los microorganismos por su efecto en el pH del medio (a). Crecimiento (b) y variación del pH del medio (c) del microorganismo acidificante con y sin par tampón

Cuadro 7- Clasificación de los microorganismos según su capacidad para crecer en ambientes con distinta actividad de agua

Halófilos: crecen en ambientes salinos (agua de mar, alimentos conservados con sal, etc.
Osmófilos: crecen en ambientes con alta concentración de azúcar (alimentos, savia de ciertos vegetales, etc.)
Xerófilos: crecen en ambientes muy secos (granos, conservas, etc.)

aw= actividad agua expresa la disponibilidad de agua, varía entre 0 y 1
Suelo agrícola= 0,9-1,0 harinas= 0,7, fiambres =0,85

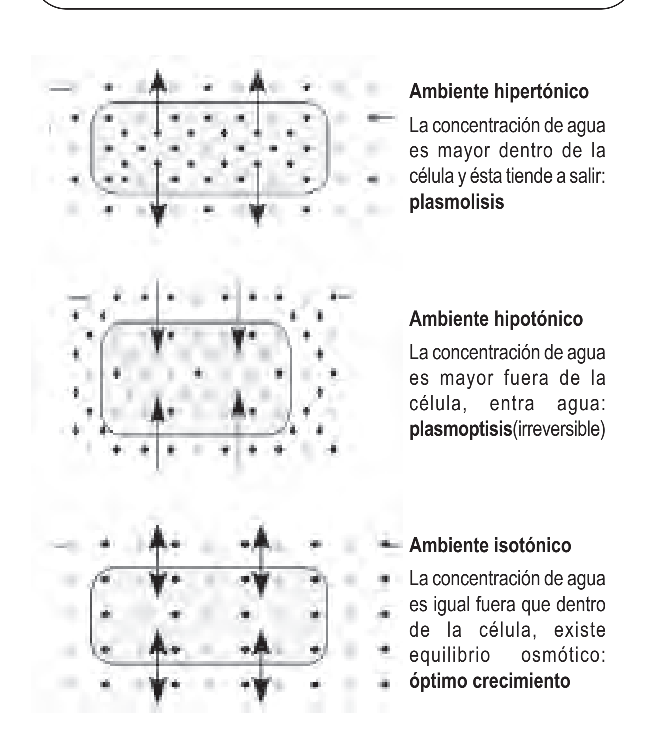


Figura 11- Microorganismos y presión osmótica

Gases

El oxígeno afecta a los microorganismos y éstos se clasifican por sus relaciones con este gas (cuadro 8 y figura 12).

El trabajo con microorganismos anaerobios obligados, como los matanogénicos, por ejemplo, es dificultoso y se requieren dispositivos especiales como las cámaras anaerobias (figura 13) (Prescott *et al.*, 1999), las cuales luego de cargarlas con tubos y cajas, se cierran herméticamente y se les hace vacío. También se pueden incubar en recipientes con granos de cebada, centeno, etc., en germinación, que se cierran herméticamente. Al poco tiempo se consume el O_2 del recipiente por la demanda biológica de los granos. Adecuados indicadores que cambian de color según el potencial redox, verifican la anaerobiosis.

Los tubos con medio líquido se llenan casi al borde, asegurando baja relación superficie/volumen. El O_2 es poco soluble en agua. Se emplean también sustancias que reaccionan con el O_2 y lo excluyen del medio (glicolato). Actualmente se adaptan cámaras de flujo laminar con circulación de gases como el N_2, H_2, CO_2, a los efectos de trabajar en ausencia de O_2. Lo mismo ocurre en las estufas de cultivo.

Otros gases inciden en los microorganismos como el N_2, CO_2, H_2, CH_4 (cuadro 9).

Algunos de ellos, como el N_2 es reducido biológicamente solamente por un grupo bacteriano: los fijadores de N_2 que son analizados en los capítulos 11 y 15.

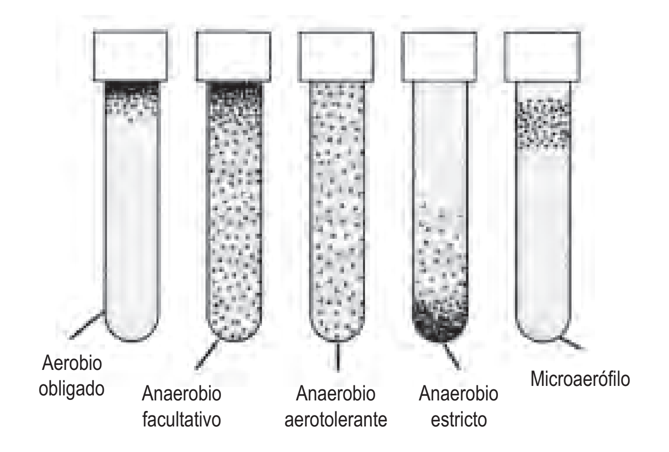


Figura 12- Clasificación de los microorganismos en relación al uso del O_2

Cuadro 8- Microorganismos y el oxígeno

Aerobios

Obligados: requieren O_2 (21% o más), Ej. *Bacillus*, hongos, etc.

Microaerofílicos: lo requieren pero a nivel menor que el atmosfético (5-10%) Ej: *Azospirillum*

Anaerobios

Facultativos: no requieren O_2, pero el desarrollo es mejor con él. Ej: levaduras, *E. coli*

Aerotolerantes: no son sensibles al oxígeno (crecen en ausencia o presencia de O_2) Ej: *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* spp.

Obligados: no toleran el O_2, mueren en su presencia. Ej: *Clostridium, Methanobacterium*

Cuadro 9- Efecto de otros gases

N_2 componente principal de la atmósfera (78%). Gas inerte: no es usado por la mayoría de los organismos, los que pueden reducir el triple enlace del N_2 con la enzima **nitrogenasa** se denominan **diazotrofos o fijadores de N_2**

CO tóxico para la mayoría de los organismos (cadena respiratoria). Puede ser oxidado a CO_2 por algunos microorganismos

CH_4 liberado a la atmósfera por microorganismos metanogénicos, gas con efecto invernadero, puede ser oxidado a CO_2 por bacterias metanotróficas

CO_2 importante gas, fuente de carbono para los autótrofos, aerobios y anaerobios, fotosintéticos o quimiosintéticos. Muchos hongos lo requieren a niveles superiores a los atmósfericos

H_2 poco usado, tóxico para la mayoría de los microorganismos, brinda energía a bacterias *Hydrogenomonas:* $H_2 + O_2 = H_2O + ATP$

Radiaciones

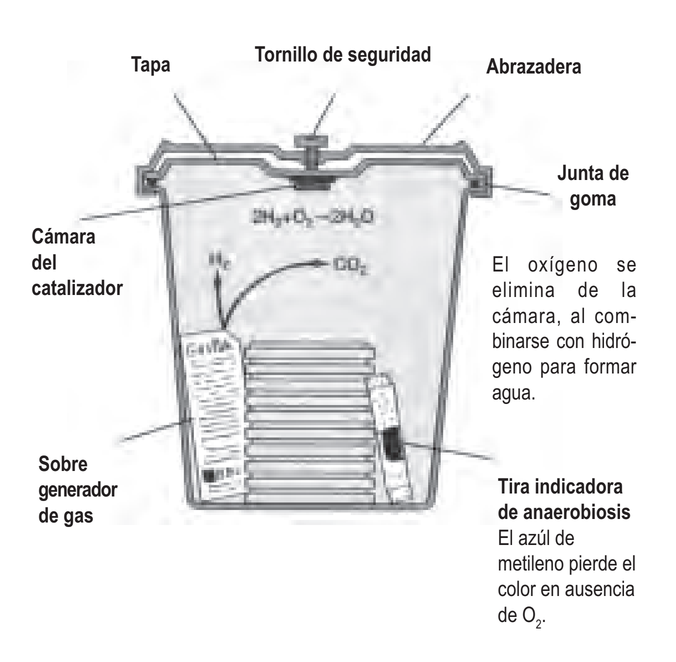


Figura 13- Cultivo de microorganismos anaerobios

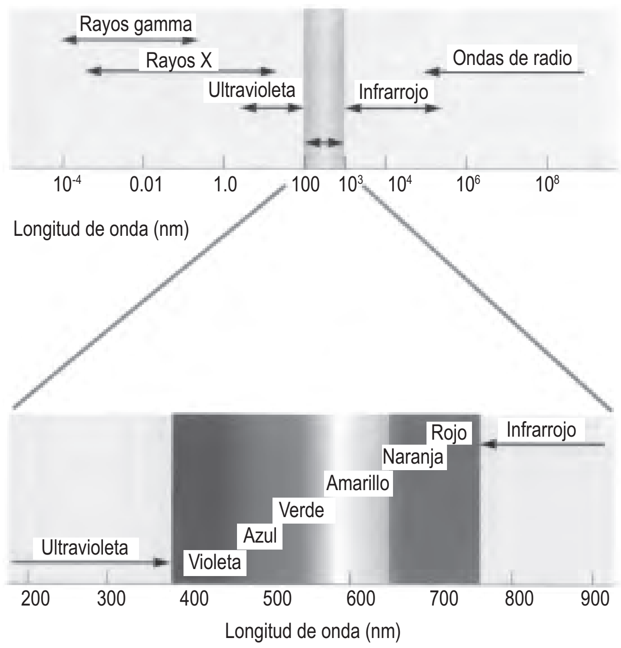


Figura 14- Radiaciones

El espectro solar incluye radiaciones de distinta longitud de onda (figura 14) (Prescott *et al.*, 1999). La luz visible (400-800 nm de longitud de onda) es muy beneficiosa y participa en la síntesis de materia orgánica en la fotosíntesis. Puede provocar sin embargo, daños en los pigmentos fotosensibles (clorofila, citocromos) ya que transfieren energía al O_2 (oxígeno activado), que es muy reactivo y letal.

La radiación ultravioleta (UV), es de longitud de onda corta (10-400nm) y alta energía. La más letal (260nm) es absorbida por el ADN, provocando dímeros de timina que inhiben su replicación. Puede ocurrir reparación por acción de una enzima que usa luz azul y separa los dímeros (fotorreactivación). Se reconoce una reactivación oscura por corte de la cadena y sustitución del segmento afectado.

En Microbiología son muy empleadas lámparas con luz ultravioleta en las cámaras de flujo laminar que complementan con su efecto germicida la acción de los filtros bacteriológicos por los que circula el aire que entra a estas cámaras de cultivo.

Las radiaciones ionizantes, de longitud de onda muy corta contienen mucha energía y producen ionización, radicales libres (OH.), que oxidan los dobles enlaces, rompen anillos aromáticos y producen polimerización de moléculas. Se usan los rayos X que se producen artificialmente entre ánodo y cátodo, los rayos gama, por la desintegración de radioisótopos.

A bajas dosis se producen **mutaciones** que pueden conducir o no a la muerte, según el segmento del gen lesionado. A mayores dosis son letales y se usan para esterilización. Algunas endosporas pueden resistir altas dosis.

Las radiaciones infrarrojas liberan gran cantidad de calor y no se usan para esterilizar. Es el caso de los hornos a microondas (1.000nm de longitud de onda). Se usan en el laboratorio para fundir medios con agar, descongelar y calentar soluciones, etc.

Factores químicos

Las sustancias químicas pueden ejercer distintos efectos sobre el desarrollo de los microorganismos:

- **no afectarlo**
- **estimularlo, son los nutrientes**
- **inhibirlo, sustancias microbiostática y microbicida, con y sin lisis (microlítica)**

La figura 15 muestra alguno de estos efectos en un cultivo bacteriano creciendo exponencialmente en un medio líquido. En el momento indicado por la flecha se ha agregado una concentración inhibitoria de la sustancia en estudio. Se aprecia diferencia en los recuentos de células totales y de viables, consecuencia de la lisis celular.

La ubicación de una sustancia química en alguna de estas categorías es muchas veces arbitraria ya que una misma sustancia puede ser nutriente o bacteriostático dependiendo de la concentración, como es el caso de los azúcares que al 1% son nutrientes para la mayoría de los microorganismos, pero a altas dosis previenen el crecimiento por plasmolisis (conservación de alimentos).

Prácticamente cualquier sustancia orgánica de origen biológico es utilizada por algún grupo de microorganismo. Aquellas sustancias naturales o artificiales que se acumulan en los ecosistemas a concentraciones no deseables para las comunidades naturales, se denominan **recalcitrantes** (capítulo 22).

Por su **toxicidad,** las sustancias químicas se clasifican en:

- **toxicidad no selectiva**, el agente actúa sobre todo tipo de células: microbianas, del hospedante. Son conocidos los **antisépticos**, que son efectivos sobre mucosas (colorantes, sales de mercurio, etc.) y los **desinfectantes** aplicados sobre superficies inertes (alcoholes, jabones, cresoles). Esta separación también es arbitraria, pues los efectos dependen de la concentración. Actúan, en general, a altas concentraciones.
- **toxicidad selectiva,** son más tóxicos para las células microbianas (incluso para Gram positivas y no para Gram negativas) y son inocuas para las células del hospedante. Estos son los agentes **quimioterapéuticos**, de gran empleo en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Son efectivas a muy bajas concentraciones.

Los factores que influyen en la acción antimicrobiana son:

a) concentración del agente químico
b) temperatura en que se emplea
c) tipo y concentración del microorganismo
d) naturaleza del material a tratar

Por sus efectos en el equilibrio biológico en ambientes naturales analizaremos el efecto de algunas de estas sustancias: las **bacteriocinas, las toxinas, enzimas, antibióticos** en los capítulos 14 y 20.

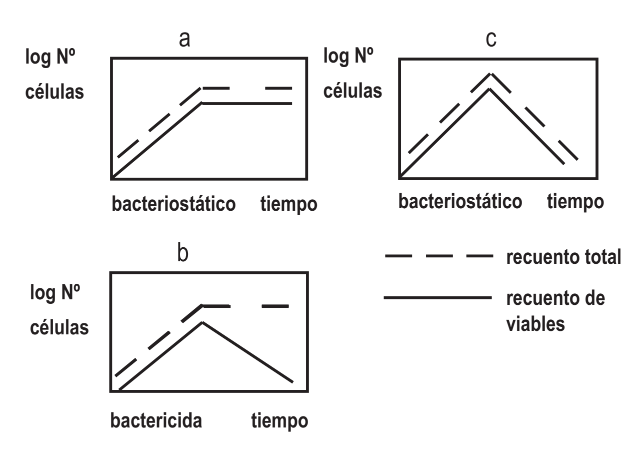


Figura 15- Tres tipos de acción de sustancias químicas sobre los microorganismos
a) bacteriostático, b) bactericida sin lisis,
c) bactericida con lisis

El cuadro 10 señala conceptos referentes a sustancias que actúan como desinfectantes: usados para la reducción o eliminación de microorganismos en objetos inanimados, como mesadas, pinzas, como son los alcoholes, formaldehido, compuestos fenólicos, detergentes. Son en general más corrosivos que los empleados como antisépticos, los que pueden emplearse además, en tejidos animales, como la piel y mucosas (nitrato de plata, ciertos colorantes, los organo-mercuriales).

Muchas veces una misma sustancia puede actuar de una u otra forma, según la concentración

Cuadro 10- Antisépticos y desinfectantes más comunes

Sustancia	Modo de acción	Usos
Etanol	Desnaturaliza proteínas y solubiliza lípidos	Antiséptico (piel)
Formaldehído	Reacciona con grupos -SH y -COOH	Desinfectante
Nitrato de plata	Precipita proteínas	Antiséptico (ojos)
Detergentes	Altera membranas	Antiséptico Desinfectante
Compuestos fenólicos	Desnaturaliza proteínas Daña membranas	Antiséptico Desinfectante

Agentes quimioterapéuticos

Los agentes quimioterapéuticos se emplean para el control microbiano dentro del huésped, deben reconocer estructuras celulares microbianas y no actuar sobre las mismas estructuras del organismo superior (acción selectiva). Son sustancias químicas utilizadas para matar o inhibir microorganismos dentro del cuerpo humano; poseen **toxicidad selectiva**: actúan sobre las células de algunos microorganismos y no sobre las células del tejido humano, para esto su acción debe estar dirigida a estructuras o funciones exclusivamente microbianas.

Los más empleados son las sulfanilamidas o análogos de factores de crecimiento y los antibióticos.

Sulfas y análogos a factores de crecimiento

Son sustancias estructuralmente similares a los factores de crecimiento, de manera que impiden su utilización ya que son inhibidores competitivos. El microorganismo toma del medio estas sustancias para sintetizar el factor de crecimiento, pero el mismo no puede hacerlo y muere, si no lo toma del medio.
Ejemplos: sulfanilamida, 5-Br-uracilo.

Sulfanilamida Ácido *p*-aminobenzoico

Ácido fólico

Figura 16- Acido para amino benzoico y la sulfanilamida

La **sulfanilamida** que es análoga pero no idéntica (figura 16) al ácido para amino benzoico (*PABA*), requerido en la síntesis del ácido fólico, vitamina y factor de crecimiento para muchos microorganismos, fue empleada en medicina antes del descubrimiento de los antibióticos. El 5 Br uracilo es análogo del uracilo, pero el correspondiente ácido nucleico no puede sintetizarse en su presencia.

Estas sustancias vuelven a emplearse en medicina, dado el problema de resistencias que están provocando los antibióticos, que pueden convertir en inefectivos a estos productos poco tiempo después de su recomendación.

Antibióticos

Los **antibióticos** son sustancias químicas de composición química variada, desde péptidos a moléculas heterocíclicas, como la penicilina (figura 17), quinonas, como las tetraciclinas, con acción antimicrobiana, producidas por un microorganismo contra otro microorganismo. Los más conocidos son los secretados por bacterias (incluidos los actinomicetes) y los hongos (figura 18). Se producen en la fase estacionaria de crecimiento, cuando las condiciones para el crecimiento son limitantes (telofase) y se consideran metabolitos secundarios.

Ejemplos de ellos: penicilina, estreptomicina, kanamicina.

La mayoría de los antibióticos empleados en salud animal y humana son producidos por hongos y bacterias. Se conocen más de 8000 sustancias antibióticas y cada año se descubren cientos de nuevos productos. Los trabajos son arduos y costosos (cuadro 11) (capítulo 20).

Cuadro 11- Producción de antibióticos

- Detección de organismos productores (siembra de suspensiones de suelo en medios sólidos: selección de colonias con halos de inhibición)
- Métodos de extracción y purificación eficientes y obtención de un producto cristalino de elevada pureza
- Acabar con un producto único en alta concentración
- Determinar el espectro de acción (microorganismos sensibles)

La resistencia desarrollada por los microorganismos a los antibióticos constituye uno de los mayores problemas en la pérdida de eficacia de estas importantes sustancias quimioterapéuticas. Los antibióticos naturales son mejorados por la industria, cambiando los radicales (R), largo de cadenas laterales, etc. como ocurre con la penicilina. (figura 17).

La formación de antibióticos se consideraba un fenómeno de laboratorio, ya que se producen en pequeñas cantidades y se pensaba que en ecosistemas naturales no alcanzarían a la célula sensible sin descomponerse y/o adsorberse a los coloides del suelo o a partículas en el agua. Pero actualmente se reconoce su participación en fenómenos de lucha biológica en ambientes naturales como el suelo o aguas, asegurando, entre otros factores, la supremacía de un microorganismo sobre sus competidores en lugares con escasos nutrientes.

Los grupos microbianos productores de antibióticos comprenden:

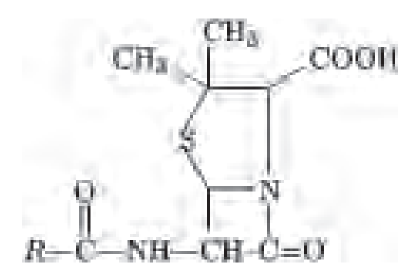


Figura 17- Fórmula de la penicilina

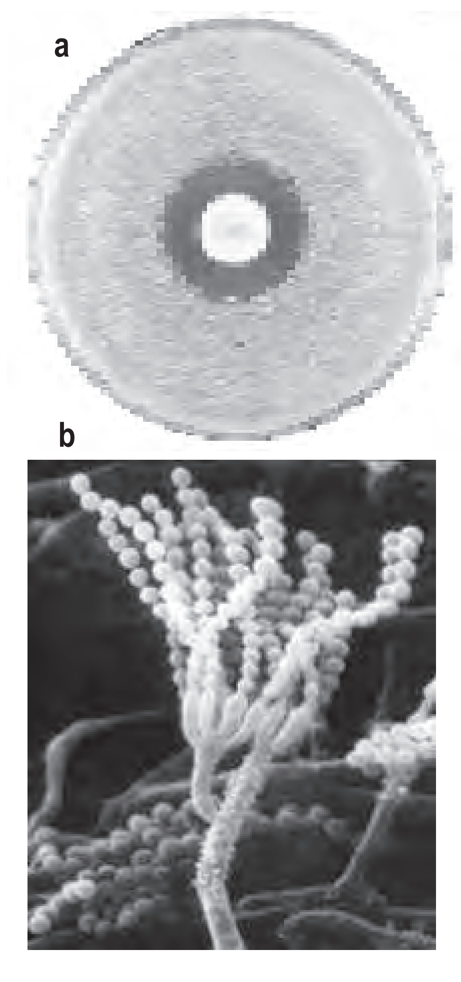


Figura 18- Hongos productores de penicilina
a) halo de inhibición
b) micelio y esporas de *Penicillum* spp

- Actinomicetes del género *Streptomyces*
- Bacterias como las del género *Bacillus*
- Hongos como los de los géneros *Penicillum y Cephalosporium*

Su modo de acción (figura 19) es variada, pueden alterar cualquier estructura sensible de la célula: inhibiendo la síntesis proteica, actuando sobre los ribosomas 70S, o su fracción 50S como la eritromicina, estreptomicina o el cloranfenicol, la síntesis de ácidos nucleicos, como la rifampicina, alterando estructura de la pared celular (penicilina, ampicilina, bacitracina, cefalosporinas), o la membrana (polimixinas), inhibiendo procesos bioenergéticos.

Fue en 1928 cuando el médico escocés Alexander Fleming redescubrió la penicilina (ya detallada en 1896 por un estudiante en Francia), al dejar durante sus vacaciones una caja de Petri con estafilococos patógenos sobre los cuales se desarrollaron las esporas del hongo *Penicillum notatum*, que inhibieron el crecimiento de las colonias bacterianas. Recién en 1940 se publicaron los trabajos de aislamiento y se extendió la aplicación de esta sustancia, a la que siguió la estreptomicina por Waksman, en 1944.

Evaluación de la concentración de un antibiótico

A los efectos de conocer la concentración de estas sustancias ya sea en sueros de pacientes, en preparados comerciales, etc. se emplean los métodos de:

1) difusión en agar, donde se siembra en superficie patógenos aerobios o un microorganismo aerobio facultativo de crecimiento rápido como el *Staphylococcus* o *Pseudomonas* y se colocan discos de papel impregnados con distintas concentraciones del antibiótico. El diámetro del halo de inhibición formado es proporcional a la concentración.

2) dilución en tubos, determina la CIM (concentración inhibitoria mínima), que es la concentración más baja del fármaco que impide el crecimiento de determinado patógeno, colocando diluciones seriadas del antibiótico en tubos sembrados con un patógeno estándar. Luego de la incubación se determina la CIM como la dilución menor que no presenta crecimiento aun luego de replicar el cultivo en medio fresco sin el antibiótico.

La figura 20 es una prueba de sensibilidad de un microorganismo patógeno frente a distintos antibióticos. Cuan

to mayor es el diámetro del halo de inhibición, más eficiente es el antibiótico, en este caso impregnado en los discos de papel de filtro. Por ejemplo, en este caso se observa que la vancomicina (V) es efectiva para *M. luteus*, pero no para el *S. albus*.

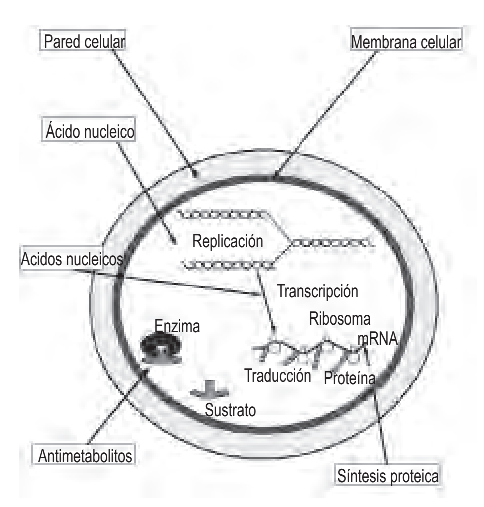


Figura 19- Modos de acción de los antibióticos

Resistencias: si bien la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos, incluidos los semisintéticos o los completamente sintéticos (antivirales o antiprotozoarios) se ha incrementado mucho en los últimos años, tanto los de espectro reducido (eficaces frente a una gama estrecha de patógenos), como los de amplio espectro, como la ampicilina, rifampicina), existe el problema de la pérdida creciente de eficacia por el desarrollo de resistencias en los microorganismos originariamente sensibles.

Los mecanismos de resistencia a antibióticos creados por los microorganismos incluyen:

a) desarrollo de una vía metabólica alternativa a la vía que el antibiótico bloquea
b) la producción de enzimas que inactivan a los antibióticos
c) alteración del sitio blanco de acción del antibiótico evitando su unión
d) bloqueo del transporte del antibiótico al interior del microorganismo

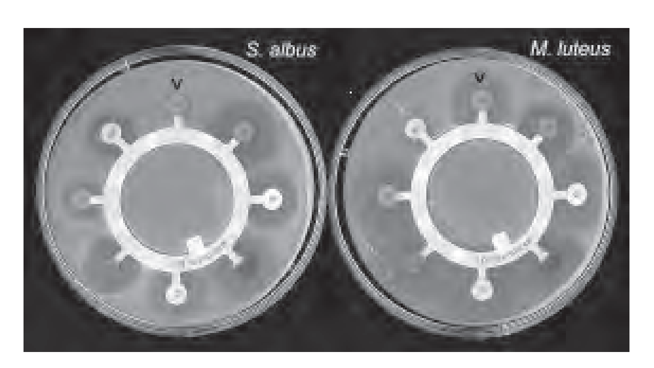


Figura 20- Antibiograma para los patógenos *Staphylococcus albus* y *Micrococcus luteus*

La formación de la **penicilinasa,** enzima que hidroliza cadenas laterales de las penicilinas, es un ejemplo de estos mecanismos de resistencia y la diseminación de estas resistencias vía plásmidos hace que rápidamente se propaguen patógenos en ambientes intrahospitalarios.

Resumen: el uso indebido de los antibióticos, su recomendación sin efectuar el aislamiento y cultivo del patógeno para conocer el antibiótico adecuado, su empleo indiscriminado en raciones para aves, alimentos para ganado, en invernáculos con ciertos cultivos de valor económico, han hecho que se deban estar cambiando continuamente las fórmulas, las cadenas laterales, los radicales unidos a la molécula principal y deba gastarse mucho tiempo y dinero en investigaciones en la búsqueda de nuevos antibióticos.

Se desarrollan programas internacionales sobre el uso racional de antibióticos como el de la Organización Mundial de la Salud (OMS) al que muchos países adhieren.

Anexo: Esterilización

Se define por esterilización el proceso por el cual se eliminan todos los microorganismos incluidas las endosporas bacterianas de cualquier objeto, superficie o medio, por remoción o muerte de éstos. Se emplean métodos físicos y químicos (cuadro 12).

Cuadro 12- Métodos de esterilización

Métodos físicos
Calor
- **calor seco**, en hornos, hornos o estufas con aire caliente a 160-180ºC por dos horas
- **calor húmedo**, en autoclaves, a 115-120ºC (1 atmósfera de sobrepresión) por 20 minutos

Filtración: láminas de asbesto, filtros bacteriológicos (0,22-0,45 μ), filtros para aire
Radiaciones
- **no ionizantes:** rayos ultravioleta: lámparas para cámaras de siembra
- **ionizantes:** rayos gamma, rayos X y rayos cósmicos (electrones de alta energía)

Métodos químicos
Gases, ejemplo: óxido de etileno, que pasa de líquido a vapor en autoclave (poco empleado por su alta toxicidad)

Efectos del ambiente en la esterilización

Temperatura: a mayor temperatura, mayor acción letal. La alta temperatura combinada con alto grado de humedad es uno de los métodos más efectivos para destruir microorganismos. El calor húmedo mata a los micoorganismos porque coagula sus proteínas y otras macromoléculas y es más rápido y efectivo que el calor seco que los destruye al oxidar a sus constituyentes químicos. Así, las esporas de *Clostridium botulinum* son destruidas entre 4 a 20 minutos a 120°C con calor húmedo, mientras que se necesitan alrededor de 2 horas de exposición al calor seco.

Tipo de microorganismo: las células vegetativas en desarrollo son mucho más susceptibles que las esporas.

Ambiente: el calor es más eficaz en medios ácidos que en alcalino. La consistencia del material, acuoso o viscoso, influye en la penetración del agente. Las concentraciones altas de hidratos de carbono aumentan, por lo general, la resistencia térmica de los organismos. La presencia de materia orgánica extraña reduce notablemente la eficacia de los agentes químicos antimicrobianos por inactivarlos a por proteger al microorganismo.

Empleo de distintas procedimientos de esterilización

Altas temperaturas
Calor húmedo en autoclave

El calor en forma de vapor en saturación y a presión es el agente más práctico para esterilizar ya que el vapor a presión proporciona temperaturas superiores a las que se obtienen a presión normal. Los autoclaves (figura 21) son recipientes herméticamente cerrados donde se regula la presión y el tiempo. En general su emplean a una presión de vapor de una atmósfera por encima de la atmosférica, lo que corresponde a una temperatura de 120°C. Para volúmenes pequeños se usan 20 minutos, si éstos son mayores se alarga el tiempo de exposición.

No se pueden esterilizar en autoclave: sustancias que no se disuelven en agua ya que el vapor no las alcanza, ni sustancias termolábiles (muchas proteínas, vitaminas, algunos hidratos de carbono), destruidas a altas temperaturas.

Tindalización: se usa cuando las sustancias no pueden calentarse por encima de 100°C. Se calienta el material (leche, por ejemplo) por media hora durante 3 días consecutivos Las esporas germinarán en la incubación y en la siguiente exposición al calor las células vegetativas resultantes serán destruidas. Es uno de los métodos más antiguos de esterilización.



Figura 21- Autoclave

NOTA: La pasteurización no es procedimiento de esterilización, pero se emplea mucho en leche, manteca y ciertas bebidas alcohólicas (cerveza, vino) que se someten a tratamientos de calor controlado que sólo matan a ciertos tipos de microorganismos y no a todos. La leche pasteurizada queda libre de patógenos y de células viables. Resisten los esporulados y los termófilos. Se usa *Mycobacterium tuberculosis* como microorganismo *test* a los efectos de evidenciar buena pasteurización. Este es uno de los microorganismos patógenos más resistentes en la leche y se destruye en 15 minutos a 60°C**.**

Se usan 63°C durante 30' ó 72°C durante 15 segundos (pasteurización rápida), luego la leche se enfría rápidamente.

Calor seco **(para materiales sólidos estables al calor)**

Horno Pasteur: para materiales de vidrio y otros sólidos estables al calor (arena, suelos, rastrojos, etc). Para materiales de vidrio de laboratorio se consideran suficientes dos horas a 160-180°C. Los materiales (pipetas, vasos, cajas de Petri) deben envolverse de a grupos para evitar su recontaminación.

Incineración: Las ansas, puntas de bisturí, varillas de vidrio, etc. se calientan a la llama de mecheros Bunsen. Se puede sumergirlos previamente en alcohol. Se coloca primero la pieza en el cono amarillo y luego lentamente en el azul (mayor poder calorífico). Se enfría cerca de la llama antes de su uso.

Preparación del material para esterilizar: Un requisito indispensable en los laboratorios de Microbiología es que los materiales y medios de cultivo utilizados estén estériles y protegidos adecuadamente para conservar la esterilidad durante su almacenamiento. En la esterilización por calor húmedo es necesario envolver los objetos en un material que permita el paso del vapor de agua y que además los proteja posteriormente de la contaminación ambiental (papel de aluminio).

Bajas temperaturas

Si bien el metabolismo microbiano está inhibido debajo de 0°C, estas temperaturas no matan a los microorganismos, sino que pueden conservarlos durante largos períodos de tiempo. Se usa para conservar microorganismos indefinidamente. Los cultivos se conservan congelados a -70°C o en recipientes con nitrógeno líquido a -196°C. La mezcla con 30-50% de glicerol, baja el punto de congelamiento de los cultivos y evita mortandad.

Esterilización por radiaciones

A- Ionizantes

Rayos gama: tienen mucha energía y son emitidos por ciertos isótopos radiactivos como es el cobalto (^{60}Co), pero son difíciles de controlar ya que este isótopo emite constantemente rayos gama en todas direcciones. Los materiales se pueden empaquetar y luego esterilizar.

Rayos catódicos (haz de electrones): se usan para esterilizar material quirúrgico, medicamentos y otros materiales. Las radiaciones penetran las envolturas y actúan a temperatura ambiente.

B- No ionizantes

Luz ultravioleta: La porción UV del espectro incluye a radiaciones desde 15 a 390nm. Las radiaciones con longitudes de onda de 265nm son las de mayor efecto bactericida (200-295nm). Se usan en cámaras de siembra, en cámaras de flujo laminar y para tratar superficies contaminadas en industrias de alimentos y leche. Posee poca capacidad para penetrar la materia por lo que sólo los microorganismos que se encuentran en la superficie de los objetos son susceptibles de ser destruidos.

Esterilización por filtración

Algunos materiales como los líquidos biológicos (suero de animales, soluciones de enzimas, algunas vitaminas y antibióticos) son termolábiles. Cuando no se puede usar las radiaciones, se procede a la filtración a través de filtros capaces de retener a los microorganismos, por el pequeño tamaño de los poros del filtro y en parte por la adsorción a las paredes del poro debido a la carga eléctrica del mismo y de los microorganismos. No se puede tener certeza de retener a los virus.

A-Filtros de membrana

Son discos de ésteres de celulosa con poros pequeños que evitan el paso de los microorganismos (0,45, 0,22 micras). Existen distintos tipos de filtro dependiendo del tamaño del poro. Son desechables. Además de usarse en la esterilización de líquidos se usan en el análisis microbiológico de aguas ya que concentran los microorganismos existentes en grandes volúmenes de agua (figura 22).

B- Filtros *HEPA* (*High Efficiency Particulate Air*) están compuestos por pliegues de acetato de celulosa que retienen las partículas (incluidos los microorganismos) del aire que sale de una cámara de flujo laminar (figura 23).



Figura 22- Filtros bacteriológicos descartables



Figura 23- Filtros para aire

Uso de agentes esterilizantes químicos

1- Oxido de etileno: el requisito esencial para un agente químico esterilizante es que sea volátil, así como tóxico para los microorganismos de manera que pueda ser fácilmente eliminado del objeto esterilizado luego del tratamiento. Normalmente se usa el óxido de etileno, un líquido que hierve a 10,7°C y se usa en la industria para esterilizar placas de Petri, jeringas y otros objetos de plástico que se funden a temperaturas superiores a los 100°C. Debido a su alto poder de penetración estos objetos se empaquetan primero y luego se esterilizan. El óxido de etileno actúa inactivando enzimas y otras proteínas con grupos sulfhidrilos (R-SH) en reacción de alquilación ($R-S-CH_2CH_2O-H$).

2- Glutaraldehído: una solución acuosa al 2% presenta amplia actividad antimicrobiana. Es efectivo frente a virus, células vegetativas y esporas de bacterias y hongos. Se usa en medicina para esterilizar instrumentos ópticos y otros.

Bibliografía

Madigan, Martinko y Parker. **Brock, Biología de los Microorganismos**, 2000. Prentice Hall International.

Prescott, Harley, Klein. **Microbiologia**, 1999. McGraw-Hill. Interamericana.

www.fagro.edu.uy/microbiologia, Guia de prácticos, 2005.

Preguntas de repaso

1) ¿Cómo determinaría el efecto de la temperatura en el crecimiento de un microorganismo de interés?
2) ¿Por qué los factores del ambiente no actúan solos? Cite ejemplos de potenciación de efectos por acción de dos o más factores.
3) Señale algún microorganismo anaerobio y ¿cómo trabajaría con él?
4) ¿Cómo emplea las radiaciones en la práctica del laboratorio?
5) ¿Cómo verificaría que la cámara de siembra de flujo laminar está estéril?
6) ¿Cómo desinfecta su mesada?
7) Diferencias entre sustancias que actúan como antisépticos y como agentes quimioterapéuticos. Ejemplos de ambos tipos de sustancias

8) ¿Por qué es necesario racionalizar el uso de antibióticos en sanidad humana?
9) ¿Cuesta mucho la búsqueda de nuevos antibióticos? ¿Por qué?
10) Acción de la penicilina sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. ¿Actúa sobre cultivos viejos?
11) Como esterilizaría:

i) cámara de siembra, ii) el ansa, iii) frascos y tubos de vidrio vacíos, iv) medios de cultivo usuales, v) medios con antibióticos, vi) solución de vitaminas, vii) leche y cerveza

5 Genética de microorganismos procariotas

Elementos genéticos en bacterias

Los elementos genéticos presentes en células bacterianas son:
a) cromosoma bacteriano
b) plásmidos
c) ácidos nucleicos de virus
d) elementos transponibles

Cromosoma bacteriano

El genoma bacteriano es haploide, está constituido por una molécula de ADN autorreplicativa (replicón), de 1.000 a 6.000Kb (4.700Kb en *E. coli*) y alberga la mayor información genética esencial de la célula (figura 1).

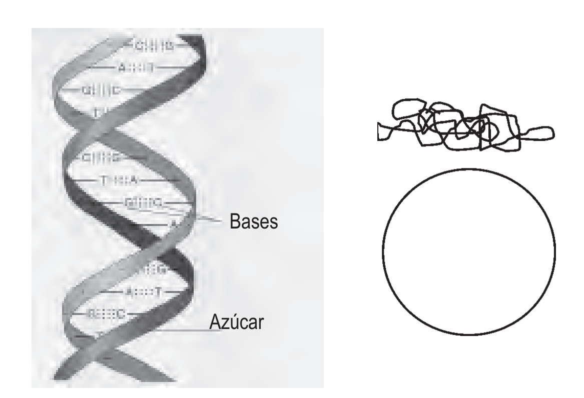


Figura 1- Genoma bacteriano

Los plásmidos están formados por ADN circular, de doble hélice, son replicones, su número de copias es característico y varía de una célula a otra. El tamaño de un plásmido y su número por célula se usan como carácter taxonómico (figura 2).Una célula puede tener plásmidos monocopia, oligocopia o multicopia. Sus principales funciones no están relacionadas a metabolismos fundamentales para la viabilidad de la célula, sino que albergan genes que codifican para funciones accesorias como ser resistencias a antibióticos, fungicidas, metales pesados, etc. Son empleados como vectores de información genética y la célula al dividirse por fisión binaria asegura previamente la duplicación de sus plásmidos, ya que éstos contienen un replicón básico que hace posible que se dupliquen las copias plasmídicas antes de la división celular (figura 3).

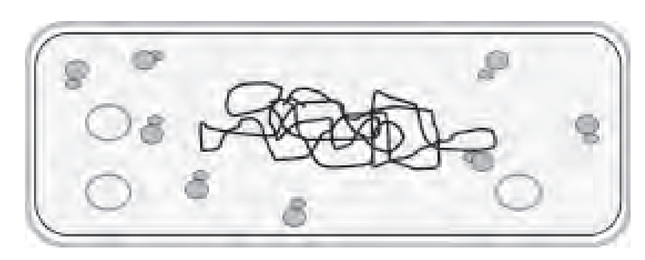


Figura 2- Esquema de una célula bacteriana con su cromosoma y tres copias de un plásmido

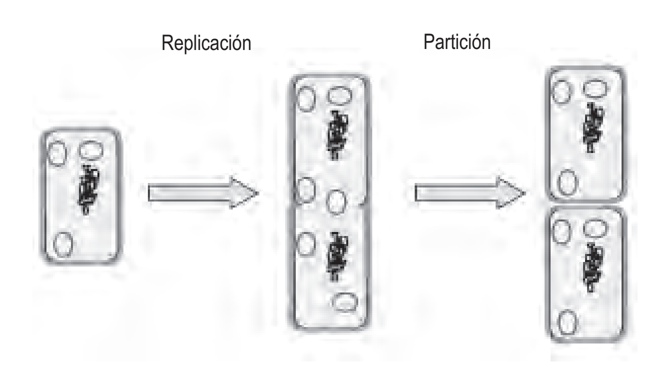


Figura 3- Mantenimiento de plásmidos

La figura 4 presenta un plásmido muy estudiado el R_1 de *E. coli*, del cual se conocen por clonación, zonas como la **región tra**, que asegura su transferencia conjugativa, la región determinante de resistencia (antibióticos, metales pesados) **R-det** y la **región par**, que asegura que las copias del plásmido se repartan a las células hijas (partición).

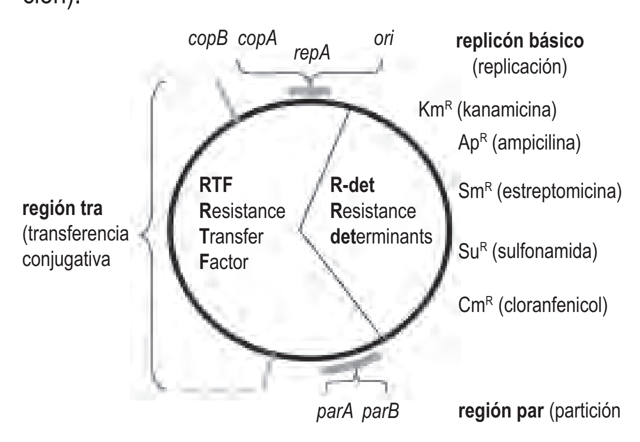


Figura 4- El plásmido R_1

Los bacteriófagos

Son virus que atacan a bacterias (capítulo 2) y su multiplicación está asegurada por un ciclo lítico y otro lisogénico. Intervienen por lo tanto en la lisis celular (ciclo lítico) o en la incorporación de material genético a células bacterianas (ciclo lisogénico).

Los elementos transponibles

Son segmentos de ADN de cientos o miles de pares de bases, con extremos repetidos invertidos, (figura 5), nunca independientes y que pueden saltar en la célula de un lugar a otro del ADN con muy baja frecuencia. El sitio lo eligen al azar y dan motivo a mutaciones. No son replicones, por lo que deben insertarse en uno.

Los más conocidos son los:

IS- secuencias de inserción, son los más simples, sólo saltan.

Tn-transposones propiamente dichos, son más complejos y además de saltar, llevan genes adicionales, por ejemplo de resistencia a antibióticos, metales pesados, etc.

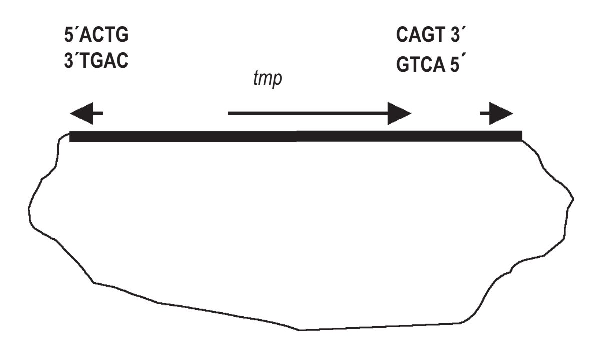


Figura 5- Transposones

En resumen: las bacterias presentan la información genética esencial en el nucleoide, falso núcleo también llamado "cromosoma bacteriano" y pueden contener información genética adicional, no fundamental, en plásmidos, profagos y transposones. Estos últimos, al no ser esenciales, pueden variar mucho en número y contenido de ADN y son responsables de la mayor parte de los cambios genéticos en bacterias.

Las variaciones genéticas en procariotas se pueden generar por dos mecanismos:

Transferencia horizontal de genes, entre bacterias próximas, por ejemplo por pasaje de un plásmido de una célula dadora a una receptora (evento intercelular)

Recombinación genética: reacción de corte, intercambio y unión de ADN, por ejemplo la incorporación de un plásmido al cromosoma (evento intracelular)

Ciclo celular bacteriano

Comúnmente las células bacterianas se dividen por

- **fisión binaria o bipartición**: la membrana celular juega un importante rol separando las dos moléculas de ADN y sintetizando a su paso la nueva pared. El septo o tabique formado separa finalmente a las dos células hijas (figura 6). **No hay mitosis**: se la designa también como amitótica
- **transferencia horizontal de genes**: existen mecanismos de intercambio genético entre procariotas que es muy diferente al de los eucariotas: el proceso es fragmentario, no intervienen los complementos cromosómicos completos de ambas células y el ADN se trans-

fiere en una sola dirección, del donador al recipiente (**se habla de formación de diploides parciales**).

Los mecanismos son especializados. Puede haber o no recombinación de materiales genéticos (incorporación del segmento transferido al material preexistente) (cuadro 1 y figura 7) (Madigan *et al.*, 2000).



Figura 6- Ciclo celular en una célula procariota

Cuadro 1- Transferencia horizontal de genes en bacterias

- también llamada sexualidad
- se da en cualquier momento del ciclo de vida de la bacteria
- con mayor frecuencia entre bacterias relacionadas, pero genes de una bacteria pueden integrar el genoma de otra bacteria muy alejada genéticamente
- por lo que el concepto de especie no se aplica claramente en bacterias

Un dispositivo muy sencillo permite determinar el mecanismo por el cuál se formaron recombinantes cuando dos cultivos se ponen en contacto: en un tubo doblado en U se siembran los cultivos, uno en cada rama, separados por un filtro bacteriológico, que deja pasar los bacteriófagos, pero no a las células.

- Si los cultivos se tratan previamente con ADNasa, entonces el proceso no fue por transformación ya que el ADN libre está expuesto a la acción de la enzima. Si igual ocurre recombinación, debe ser por alguno de los otros mecanismos de transferencia horizontal.
- Sin ADNasa, la recombinación debe ocurrir por transducción o por transformación, ya que el filtro deja pasar virus pero no bacterias. Si no ocurre es que se requiere contacto célula-célula (conjugación).

En resumen: la variabilidad genética en bacterias se logra por:
Recombinación (transferencia horizontal de genes por transformación, transducción, conjugación)
Mutaciones (transferencia vertical de genes)

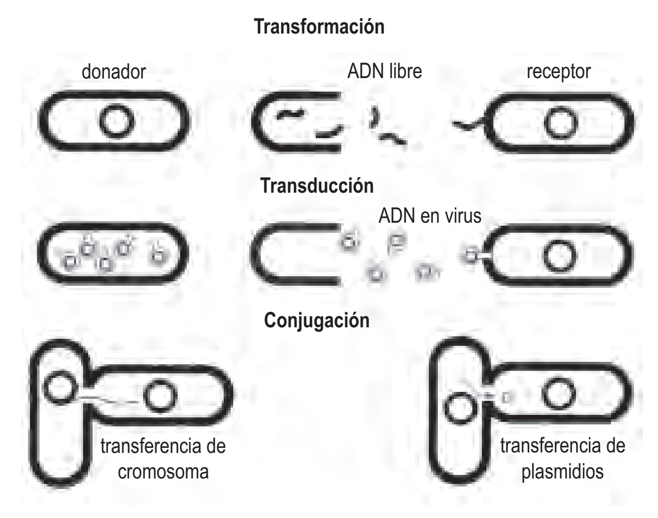


Figura 7- Mecanismos de transferencia horizontal de genes en bacterias

Recombinación

Involucra intercambio físico de material genético entre elementos genéticos. Se generan nuevas combinaciones: "se une lo que antes estaba separado y se separa lo que antes estaba unido". Es un evento intracelular. Se reconocen:

a) Recombinación homóloga o general: el intercambio se realiza en segmentos extensos de secuencias homólogas o muy parecidas
b) Recombinación específica de sitio: el intercambio se opera en segmentos muy cortos de secuencias específicas (ejemplo integración del genoma fágico al cromosoma bacteriano).
c) Recombinación ilegítima: es la transposición: el intercambio se opera por salto a cualquier secuencia, al azar.

Transferencia horizontal de genes en bacterias

Ocurre por tres mecanismos (figura 7):

1. **conjugación**: la transferencia es resultado de un contacto célula-célula (se parece al proceso sexual en eucariotas). El segmento de ADN transferido depende del tiempo de contacto y se realiza a través de un pelo sexual.
2. **transducción,** donde la transferencia está mediada por partículas virales.
3. **transformación**, donde participa el ADN libre en pequeños trozos que penetran por la membrana. La célula dadora en general se lisa y el ADN queda en la naturaleza expuesto a la biodegradación, acción de la ADNasa, etc. Pero en ambientes muy colonizados, como la rizosfera (zona del suelo en contacto con las raíces) puede llegar a células receptoras que lo ingresan en su interior.

Cuando en la transferencia de genes se involucran aspectos nutritivos, de resistencias a antibióticos, etc. es posible detectar los recombinantes por siembra en medios selectivos donde no crece la célula receptora pero si la recombinante. Por ejemplo, si la célula receptora no sintetiza triptofano (Trp^-), no se desarrollará al sembrarla en caja de Petri con medio sin ese aminoácido, pero al recibir ADN de células Trp^+, las recombinantes formarán colonias en el medio sin el aminoácido.

Transformación

El ADN libre (lisis celular) lineal se debe unir a la superficie de la bacteria mediante una proteína de unión, luego de lo cual entran o bien las dos hebras o previamente una **nucleasa** degrada una de ellas y la otra entra en la célula. El trozo de ADN se asocia a una proteína específica que evita el ataque por nucleasas hasta su integración con el ADN con ayuda de una proteína llamada RecA, mediante un proceso de recombinación. En la replicación de este ADN se forma una célula igual a la parental y otra recombinante.

Las bacterias son escasamente transformadas por plásmidos, ya que éstos deben permanecer con doble hélice y circulares para replicarse. La figura 8 muestra la transformación de una bacteria sensible a la ampicilina (Ap^s) que se convierte en resistente (Ap^R) por la adquisición de un plásmido con esa resistencia.

Muchos ensayos se han realizado a los efectos de aumentar la competencia de ciertas bacterias de interés para transformar, como por ejemplo tratarlas con altas concentraciones de iones calcio.

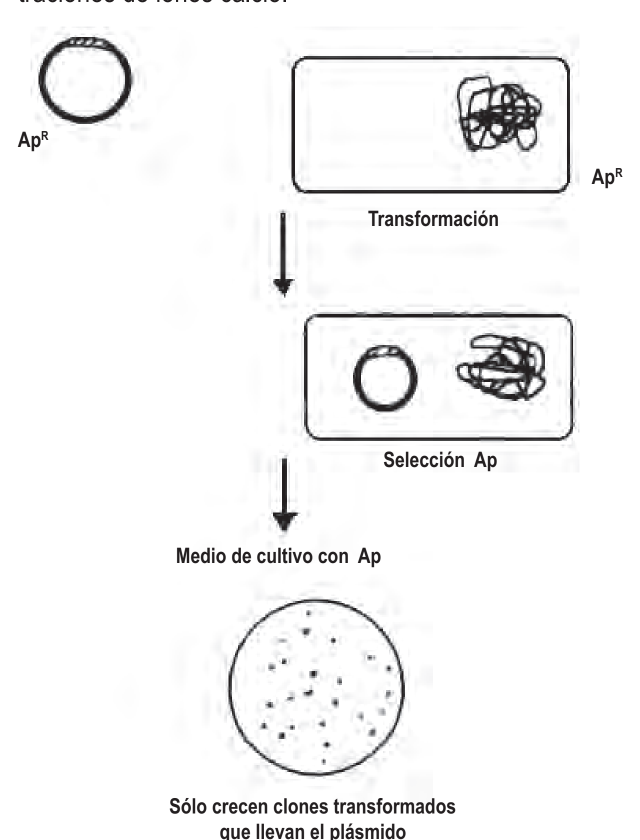


Figura 8- Transformación por un plásmido

Transducción

El ADN que se transfiere proviene de un virus y el proceso puede ocurrir en dos formas:

Transducción generalizada (figura 9) (Madigan *et al.*, 2000), en donde una porción del ADN de una célula es parte del genoma de un virus, reemplazando al genoma del mismo (error de copia), se trata ahora de un virus defectivo. Cuando la población de una bacteria sensible es infectada por un fago, pueden iniciarse los eventos del ciclo lítico. Durante este proceso, las enzimas responsables del empaquetamiento del ADN viral en la cápside, pueden fallar y se encierra ADN del huésped en algunos de estos virus. Estas partículas se liberan junto a los viriones normales, de modo que el lisado contiene una mezcla de viriones normales y partículas transductoras.

Transducción especializada: en este proceso se generan partículas transductoras de un solo tipo, por que todas ellas contienen un mismo fragmento de ADN de la bacteria. Se forman por la escisión imprecisa del genoma fágico que lleva un segmento de ADN de la bacteria adyacente al sitio donde estaba integrado.

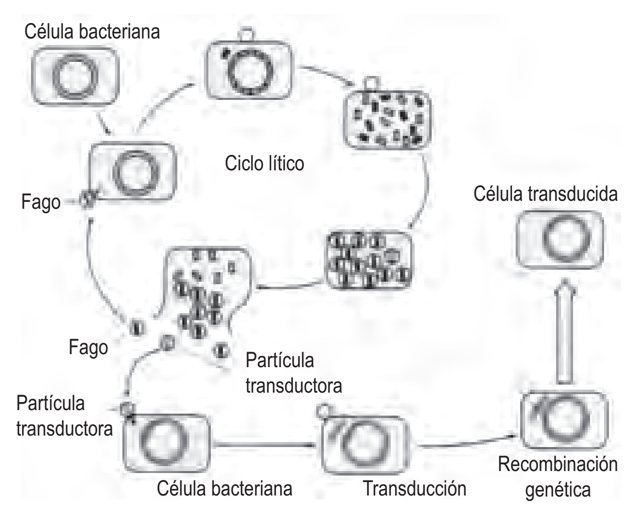


Figura 9- Transducción generalizada

Conjugación

Es un proceso de transferencia genética que involucra contacto célula a célula. Es un mecanismo codificado por plásmidos. Un plásmido conjugativo emplea este mecanismo para transferir una copia del mismo a una nueva célula. La evidencia sugiere que una de las hebras del ADN deriva del donante y la otra es recientemente sintetizada en la célula receptora durante el proceso de transferencia. El proceso requiere contacto célula-célula para permitir el pasaje de una hebra del ADN de un plásmido (se requiere una enzima que corte).

Una molécula complementaria de ADN se sintetiza entonces en la célula receptora. El factor F es un plásmido conjugativo muy conocido que presenta alta eficiencia en la transferencia. Las células que portan el plásmido F se denominan F^+ y las cepas sin el plásmido F, o sea recipientes para éste, se denominan F^-. Cuando una célula F^+ transfiere el plásmido F a una receptora, ésta última se convierte en F^+, o sea dadora en una conjugación (figura 10).

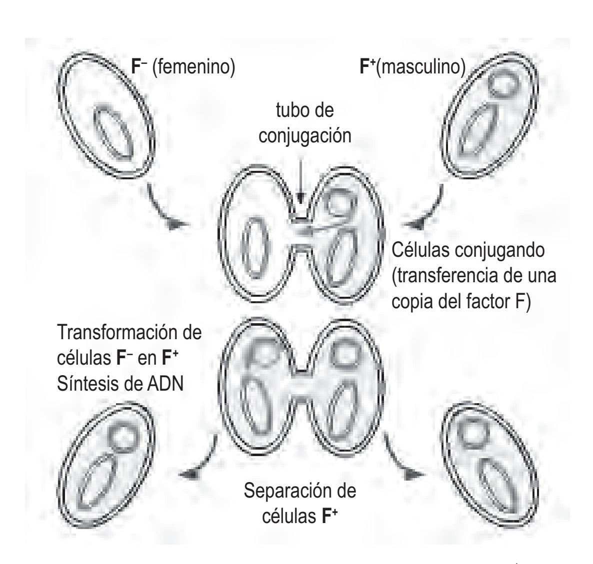


Figura 10- Transformación de células F^- en F^+

La figura 11 (Madigan *et al.*, 2000), muestra una microfotografía electrónica de dos células bacterianas unidas por el pelo sexual o *pili*, que facilita la transferencia de material genético por conjugación.

Por este mecanismo ocurre la transferencia de resistencia a biocidas, como los antibióticos, ocasionando serios problemas en la salud humana.

Formación de cepas Hfr (alta frecuencia de recombinación y movilización del cromosoma) (figura 12).



Figura 11- Conjugación entre dos bacterias, vía el pelo sexual o *pili*

El plásmido F de *E.coli* es conjugativo (es un episoma, o sea se puede integrar al cromosoma) y también puede movilizar el cromosoma durante el contacto célula-célula. La conjugación permitirá la transferencia de grandes zonas de cromosoma del donante a la célula receptora. Las células que poseen el plásmido F integrado por recombinación a su cromosoma se denominan Hfr.

La presencia de un plásmido F altera propiedades de la célula: capacidad para sintetizar el *pili* llamado F, facilitando la movilización.

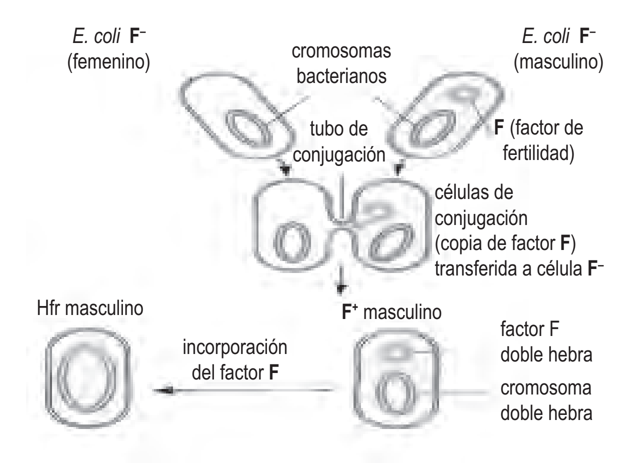


Figura 12- Formación de células Hfr (alta frecuencia de recombinación)

En resumen: la conjugación es un mecanismo de transferencia de ADN en procariotas que requiere contacto célula a célula y está controlada por genes contenidos en ciertos plásmidos, como el llamado F e involucra la transferencia del plásmido de una célula dadora a una receptora. Pero, además, otros elementos genéticos, incluyendo el cromosoma de la célula dadora, puede, en ocasiones, ser movilizado y transferido. La transferencia del cromosoma del huésped no es generalmente completa pero este mecanismo resultó muy útil en la construcción de los mapas genéticos de las bacterias, asociando los genes transferidos a diferentes períodos de contacto.

Mutaciones

Una mutación es un cambio genético heredable en la secuencia de bases de los ácidos nucleicos de doble hélice del genoma de un organismo. El mutante difiere de la célula parental en su genotipo, es decir, en los genes que el organismo posee. Pero además, puede alterarse su fenotipo.

Una bacteria aislada de la naturaleza se refiere como "tipo salvaje". Una mutante puede obtenerse a partir de estas cepas o de otras derivadas de ella, es decir de otra mutante. Se nombran por el:

Genotipo: ej: *hisC* indica uno de los genes de *E. coli* que codifican para la síntesis de histidina, mutaciones en este gen se refieren como *hisC1*, *hisC2*, etc.
Fenotipo: *E.coli* His^{+}, significa que esta cepa puede sintetizar histidina, mientras que *E. coli* His^{-}, no.

Aislamiento de cepas mutantes

Algunas resultan fácilmente **detectables,** por aparición de pigmentos, pérdidas de vesículas de gas, de flagelos, ya que las colonias cambian de aspecto. Otras, como las que adquieren cierta resistencia, como a un antibiótico, son fácilmente aisladas en cajas de Petri, en un medio con el antibiótico en cuestión. Los métodos de selección de cepas mutantes se han desarrollado mucho y permiten su aislamiento a partir de una población con millones de organismos parentales.

Mutantes nutricionales pueden ser detectados por la técnica de replicación en placa: se toma una copia de las colonias creciendo en medio completo con un disco de terciopelo o de papel de filtro. Esta copia se replica tocando la superficie de cajas con medio mínimo. Las colonias del tipo parental crecen normalmente, mientras que las de las mutantes, no lo hacen. Su lugar vacío (en la réplica) es señal de que corresponde a una mutante en el medio completo. Esta se marca y se busca su homóloga en el medio original, se repica, purifica y se caracteriza.

Se designa como:
Protótrofa: a la cepa tipo salvaje de la cual derivó la mutante
Auxótrofa: a la mutante nutricional que requiere factores de crecimiento, ejemplo auxótrofa para el triptófano, vitamina B_{12}, etc.

Las mutaciones pueden ser espontáneas o inducidas. Las **espontáneas** ocurren por errores en la replicación del cromosoma, por recombinación o por transposición. Si bien su frecuencia es baja, en cultivos densos, con varios millones de células, varias células/mL pueden ser mutantes. Las mutaciones pueden implicar cambios de una o dos bases (mutaciones puntuales) o alteraciones que incluyan varias pares de bases (deleciones, inserciones, inversiones).

Mutaciones inducidas: ocurren por la acción de agentes físicos o químicos que dañan el ADN, induciendo la aparición de mutaciones. Se habla de agentes mutagénicos. Muchos son homólogos de bases, se copian pero luego surgen errores de copia (bromouracilo, aminopurina). Otras sustancias reaccionan con el ADN (ácido nitroso, hidroxilamina), colorantes (acridinas, bromuro de etidio), radiaciones (UV, ionizantes, etc.).

Existe mutagénesis que ocurre sin el empleo de agentes físicos o químicos, a través del proceso conocido como mutagénesis con transposones, donde la inserción de un elemento transponible ocurre dentro de un gen, determinando en general la pérdida de su función. La tecnología actual del ADN recombinante permite inducir mutaciones específicas (mutagénesis dirigida a un sitio), en ciertos genes que pueden ser luego insertados en células recipientes apropiadas. Las mutantes son seleccionadas y empleadas en estudios específicos.

Finalmente, la figura 13 presenta un esquema que muestra las posibilidades de variabilidad genética entre bacterias lo que explica su inmensa adaptación a distintos ambientes, condiciones ambientales y situaciones extremas. Por su alta frecuencia de transferencia horizontal de genes todas las bacterias compartirían un conjunto común de genes, que cada bacteria descarta o conserva según sus requerimientos. La ausencia de límites claros de especie o de tiempo en la transferencia sexual permite una muy rápida adaptación a cambios ambientales. Esta enorme plasticidad genética generó la biosfera actual y posibilitó la existencia de los eucariotas.

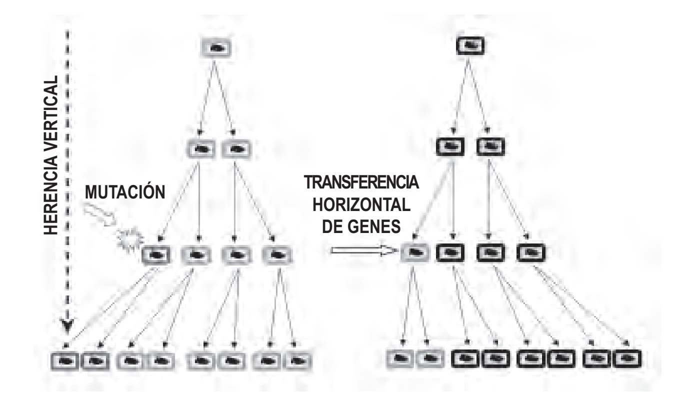


Figura 13- Variabilidad genética en bacterias

Bibliografía

Madigan, Martinko y Parker. **Brock**, **Biología de los microorganismos,** 2000 Prentice Hall International
Prescott, Harley, Klein. **Microbiología**, 1999 McGraw-Hill.Interamericana
www.fagro.edu.uy/microbiologia: Contenidos: Genética de procariotas

Preguntas de repaso

1) Concepto de bacteriófago

2) ¿Cómo puede poner en evidencia la presencia de ellos específicos para *Rhizobium loti*, en un suelo?
3) ¿Cuál es la etapa más importante en el proceso de infección?
4) Razón por la cual el virus puede infectar sólo huéspedes específicos
5) Relaciones entre los bacteriófagos y las células bacterianas
6) Concepto de mutación en bacterias y cómo se pueden producir
7) ¿Las mutaciones pueden revertir?
8) ¿Cuándo un elemento genético puede recombinarse en una célula receptora?
9) Mencione similitudes entre los procesos de transformación y transducción y sus diferencias con la conjugación
11) Diferencias principales entre la transducción generalizada y la especializada
12) Aplicaciones prácticas del proceso de conjugación
13) Aplicaciones de estos mecanismos en ingeniería genética para la obtención de materiales transgénicos.

6 Taxonomía bacteriana y filogenia

La necesidad de agrupar y clasificar a los microorganismos surgió muy temprano en los estudios de la microbiología. Los criterios empleados para agrupar, sobretodo con las bacterias incluyeron categorías nutricionales (autótrofas, heterótrofas), características tintoriales (Gram negativas y Gram positivas), respuestas al oxígeno (aerobias, anaerobias) rango de temperatura del crecimiento, etc.

La taxonomía (cuadro 1) clasifica a los organismos en grupos (taxones) en base a similitudes, le asigna nombres a los mismos e identifica organismos desconocidos (los ubica en algunos de los taxones definidos). La experiencia generada con la clasificación de otros seres vivos, como los animales y los vegetales ayudó a construir una aproximación para el caso de los microorganismos y en especial para las bacterias. La taxonomía es una ciencia que requiere la determinación de numerosos caracteres y luego una interpretación rigurosa de los mismos.

Se debe distinguir entre **taxonomía** e **identificación** de las bacterias. La primera conduce a una caracterización exhaustiva, con aplicación de la teoría y los métodos de clasificación, la formación de grupos o taxones y su nomenclatura. La **identificación** constituye el lado práctico de la taxonomía, tiende a caracterizar a un aislamiento por un número limitado de análisis, seleccionados en general para el problema en cuestión, efectúa comparación con especies conocidas y asigna el aislamiento a una especie conocida o aconseja un estudio taxonómico más profundo.

Especie: es la unidad taxonómica básica y se define como el grupo de organismos que tiene un alto grado de similitud en sus propiedades fenotípicas y que difieren de otros grupos de organismos o cepas en el caso de las bacterias, en muchas características fenotípicas independientes. En general presentan: % de hibridación de sus ácidos nucleicos superior al 70% y el híbrido debe presentar una estabilidad térmica de menos de 5ºC (cuadro 1).

Cuadro 1- Conceptos generales en taxonomía microbiana

Taxonomía o sistemática:
- **clasifica** organismos en grupos (taxones) en base a su similitud
- **asigna nombres** a los taxones
- **identifica** organismos desconocidos (determina si un organismo pertenece a alguno de los taxones definidos antes).

Especie:
- unidad taxonómica básica
- grupo de cepas que tiene un alto grado de similitud en sus propiedades y que difieren de otros grupos de cepas en muchas características fenotípicas independientes
- definición metodológica:
  - % de hibridación ADN_1-ADN_2 > 70%
  - Tm < 5ºC (estabilidad térmica del híbrido ADN_1-ADN_2)

En las bacterias se habla más de taxones que de especies, por la continua evolución de caracteres morfológicos y genéticos. Las unidades de clasificación de las bacterias o taxones presentan la siguiente jerarquía:

Dominio: Bacteria: ejemplo Eubacteria
Reino: Proteobacteria
Sección: γ Proteobacterias
Clase: Zymobacteria
Orden: Enterobacteriales
Famila:*Enterobacteriaceae*
Género: *Shigella*
Especie: *S. flexneri*
Cepa: población que desciende de un cultivo puro, pueden diferenciarse unas de otras de varias maneras.
Biovariedad: variantes de cepas caracterizadas por diferencias bioquímicas y fisiológicas. Las morfovariedades se diferencian del punto de vista morfológico y las serovariedades, por sus caracteres antigénicos.

Una cepa de una especie se designa como **cepa tipo.** Suele tratarse de uno de los primeros aislamientos y estar muy bien caracterizada.

Un género es un grupo bien definido de una o más especies que está claramente separado de otros géneros.

La taxonomía toma en cuenta numerosos caracteres que se resumen en el cuadro 2.

Los caracteres son evaluados en **clave dicotómica** y las familias, géneros, especies, sub-especies, biovariedades, son descriptas en el *Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology* (última edición 2001) y en otras aproximaciones taxonómicas.

El cuadro 3 (Prescott *et al.*, 1999) muestra los niveles o rangos empleados con mayor frecuencia: especies, géneros, familias, órdenes, clases y reinos. Los nombres de los grupos microbianos de cada nivel o rango tienen terminaciones (sufijos) característicos: **ales** para órdenes, **eae** para familias. Obsérvese que las secciones son categorías informales empleadas para dividir el Manual en partes manejables (30 o más secciones con títulos formales como: metanógenicos, *Bacillus, Lactobacillus*, Halobacterias, Espiroquetas.

Cuadro 2- Caracteres empleados en estudios taxonómicos

Fenotípicos

caracteres culturales en:
i) medio líquido (velo, turbidez uniforme, sedimento)
ii) en medio sólido (tamaño, forma, bordes, de la colonia)

caracteres morfológicos
tamaño, forma, forma de agruparse de las células en medio líquido

caracteres tintoriales
coloraciones simples, diferenciales (Gram), específicas (esporas, flagelos, etc.)

Fisiológicos y metabólicos
Empleo de fuentes de C, N, S, etc., formas de obtención de energía, producción de sustancias bióticas (vitaminas) y abióticas (antibióticos)

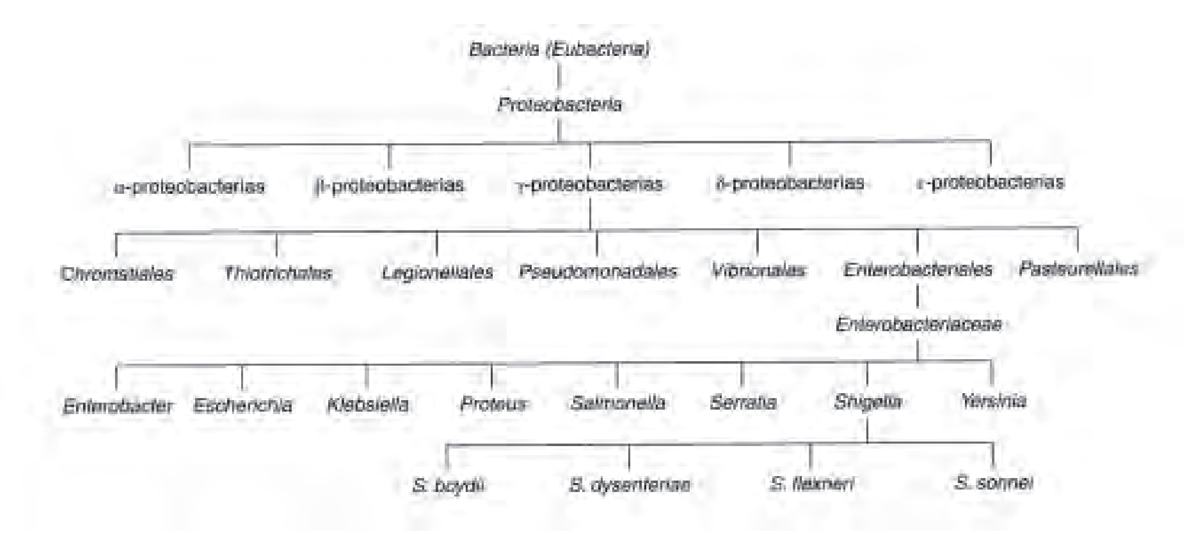
Serológicos
Reconocimiento por reacciones antígeno (somáticos o flagelares de la bacteria) y anticuerpos específicos producidos contra esas moléculas no presentes en animales de sangre caliente: conejos, cobayos, caballo

Ecológicos, patológicos y/o simbióticos
Asociaciones con animales, plantas, etc., efecto de factores del ambiente

Genéticos
Análisis del número y tamaño de los plásmidos, intercambio de genes mediante los procesos de recombinación

Moleculares
Estudio de proteínas y ácidos nucleicos, muy desarrollados en la actualidad, proporciona valiosa información sobre relaciones entre microorganismos

Cuadro 3- Jerarquías en taxonomía. En este caso simplificado se cita el ejemplo de los miembros del género *Shigella* y sus rangos taxonómicos superiores.



Evidentemente, ésta constituye una clasificación artificial que no permite inferir relaciones filogenéticos o evolutivas entre microorganismos ni determinar evolución de funciones (respiración, fotosíntesis, etc.). Tampoco dice nada de organismos no cultivables y por lo tanto aun no aislados en cultivo puro, que se sabe constituyen una importante fracción del germoplasma microbiano en la naturaleza.

Caracteres clásicos

Los caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, ecológicos y genéticos han sido empleados en taxonomía microbiana desde hace mucho tiempo. Resultan útiles e la identificación microbiana y pueden brindar también información filogenética.

Caracteres morfológicos

Son muy empleados en taxonomía ya que resultan fáciles de estudiar, son bastante estables por ser la expresión de numerosos genes, suelen ser estables del punto de vista genético y en general, sobretodo en los eucariotas, no varían mucho con el ambiente. El cuadro 4 presenta algunos de los caracteres morfológicos empleados.

Cuadro 4- Algunos caracteres morfológicos empleados en la clasificación e identificación microbiana

Carácter	Grupos microbianos
Forma celular y tamaño celular	Muy empleados en todos los grupos microbianos
Morfología de las colonias	Todos los grupos principales
Estructuras subcelulares	Todos los grupos principales
Tinciones	Bacterias, algunos hongos
Cilias y flagelos	Todos los grupos principales
Movilidad	Bacterias deslizantes, espiroquetas
Forma y ubicación de las endosporas	Bacterias formadoras de endosporas
Morfología y localización de conidios y esporas eucariotas	Algas, hongos
Inclusiones celulares	Todos los grupos principales
Color	Todos los grupos principales

El aporte de estos caracteres se ha incrementado luego del empleo del microscopio electrónico de transmisión o de barrido, cuyo poder de resolución (1nm) supera ampliamente a los ópticos (0,2 micras).

La coloración de Gram continúa siendo una importante herramienta en la taxonomía bacteriana ya que permite separar grupos según composición y estructura de la pared celular procariota.

Caracteres fisiológicos y metabólicos

Estos constituyen una importante contribución en la taxonomía ya que están directamente relacionados con las enzimas microbianas y las proteínas de transporte. Como las proteínas son resultado de síntesis génica, estos estudios metabólicos permiten una comparación indirecta de los genomas microbianos. En el cuadro 5 se muestran algunas de determinaciones más empleadas.

Cuadro 5- Caracteres fisiológicos y metabólicos usadas en la clasificación microbiana

Fuentes de carbono, nitrógeno, azufre, de energía, etc.
Componentes de la pared celular
Tipos de fermentación y productos finales
Clasificación nutricional
Efectos de factores del ambiente: temperatura, pH, gases, solutos, etc. Valores óptimos y rangos
Producción de luz (luciferasa)
Metabolismos bioenergéticos
Pigmentos fotosintéticos
Necesidades y tolerancia a la sal
Metabolitos secundarios: antibióticos, toxinas, pigmentos
Sensibilidad a inhibidores metabólicos y antibióticos
Inclusiones citoplasmáticas: fosfatos, azufre, fenoxialcanos

Los estudios llevan en general tiempo ya que el microorganismo en estado puro se cultiva en medios con sustratos específicos. Se evalúa el empleo de algunos de ellos (azúcares, nitratos, etc.) por la desaparición del mismo y/o por la aparición de productos finales del metabolismo. Los perfiles metabólicos de poblaciones de interés se pueden evaluar en sistemas comerciales como el *Biolog,* donde se siembra el aislamiento en una placa con numerosos orificios, cada uno con una fuente de carbono diferente. Luego de la incubación la placa se lee en un lector electrónico (aparece color donde hubo crecimiento y utilización del sustrato).

Caracteres ecológicos

Son propiedades que afectan la relación de los microorganismos con el ambiente, como las relaciones simbióticas, la producción de enfermedades en un huésped específico, las preferencias de habitat, las necesidades de ciertos rangos de temperatura, pH, O_2, concentración osmótica. Algunas características de crecimiento se consideran también caracteres fisiológicos.

Caracteres genéticos

Resultan de indudable aplicación en la taxonomía de eucariotes, donde la especie se define en términos de reproducción sexual. En procariotas, el fenómeno es fragmentario, pero de todas formas se realizan grandes avances en el estudio de intercambio de genes mediante la recombinación (transformación, transducción, conjugación) (capítulo 5). La primera ocurre principalmente entre especies bacterianas diferentes, pero raramente entre géneros. Se han realizado estudios de transformación con varios géneros: *Bacillus, Micrococcus, Rhizobium* y otros. Pero, puede suceder que no ocurra transformación por motivos diferentes a la homología del ADN.

La conjugación se ha empleado mucho en estudios taxonómicos. Así entre las bacterias entéricas, *Escherichia* puede conjugar con los géneros *Salmonella* y *Shigella*, pero no con *Proteus* ni *Enterobacter*, lo que concuerda con otros datos que muestran que los tres primeros géneros están más estrechamente relacionados entre si que con los otros dos restantes.

El número y tipo de plásmido presente en células bacterianas también se emplea con fines taxonómicos, ya que

muchas veces codifican para un carácter de importancia como la sensibilidad a antibióticos, metales pesados, etc. En general, conviene emplear en la clasificación un grupo grandes de caracteres (ver taxonomía numérica).

Características moleculares

Los abordajes más modernos en la taxonomía se basan en los análisis de proteínas y ácidos nucleicos, que brindan importante información sobre relaciones entre microorganismos.

Comparación de proteínas

Las secuencias de aminoácidos en las proteínas son reflejo de las secuencias de ARNm y por lo tanto están relacionados con los genes que las codifican. Se determina la secuencia de aminoácidos de proteínas con la misma función (si éstas son similares, es muy probable que los organismos que las poseen estén estrechamente relacionados).

Como estos estudios son largos y caros, se han empleado técnicas indirectas de comparación de proteínas, como la movilidad electroforética de las mismas, o el empleo de anticuerpos específicos que permiten distinguir proteínas muy similares.

Composición de ácidos nucleicos

Los genes microbianos se pueden comparar directamente por análisis de su genoma. En el cuadro 6 se resumen las técnicas empleadas que incluyen determinación del contenido de bases guanina y citosina (G+C) e hibridación de sus ácidos nucleicos.

Composición de bases del ADN, constituye una de las primeras técnicas empleadas en el análisis del genoma microbiano. Las 4 bases púricas y pirimídicas que integran los ácidos nucleicos son: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T), A se aparea con T y C con G.

El porcentaje de G+C del ADN refleja la secuencia de bases y se determina por análisis cromatográfico de las bases luego de hidrólisis o en forma más sencilla por la **temperatura de fusión (Tm)** del ADN.

En el ADN bicatenario tres puentes de H unen los pares GC y dos los AT. De modo que cuanto mayor es la proporción de GC que se encuentre en el ADN, sus cadenas se separarán a mayor temperatura. La fusión se puede seguir en espectrometría ya que la absorbancia a 260nm (UV) del ADN aumenta durante la separación de las cadenas (figura 1). Al calentar una muestra de ADN la temperatura sube durante la separación de las hebras, a medida que se van rompiendo los puentes de H. Se alcanza una meseta cuando todo el ADN se convierte en monocatenario. El punto medio de la curva proporciona la temperatura de fusión, medida directa del contenido de GC.

También se obtiene este dato centrifugando el ADN en un gradiente de CsCl (la densidad del ADN aumenta proporcionalmente con el contenido de GC).

Cuadro 6- Análisis clásicos de ADN

Composición de bases

$$\% C+C = \frac{G + C}{G+C+T+A} \times 100$$

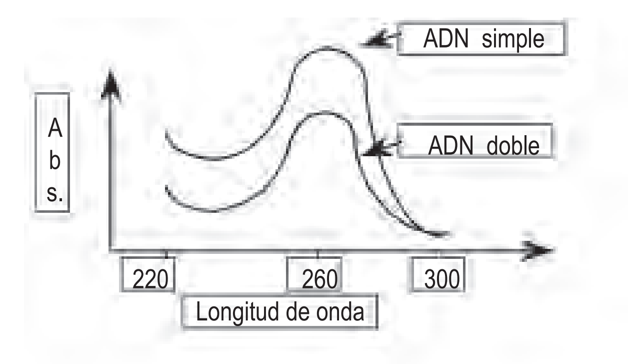
* gradiente de CsCl
* desnaturalización térmica

criterio de exclusión: % GC > 3 ➛ dos especies diferentes
% GC > 10 ➛ dos géneros diferentes

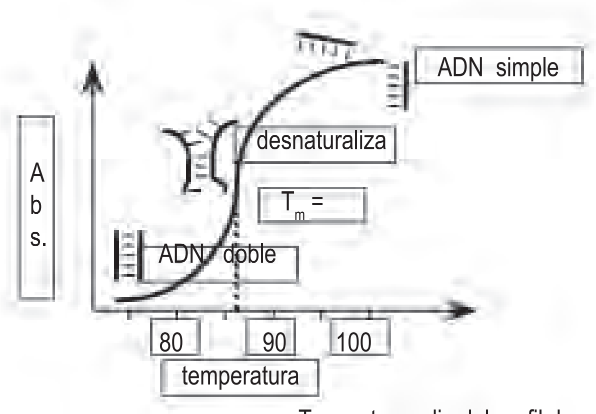
Hibridación ADN-ADN
- depende de la secuencia
- determinación por:

* % hibridación de ADN_1 marcado con ADN_2
* < T_m del híbrido y del cultivo puro
  - es el criterio actual de **definición de especie**:
    - > 70% de hibridización
    - Tm < 5ºC

El cuadro 7 presenta algunos de los valores de GC en diversos organismos.



Aumento de Absorbancia del ADN a 260nm por desnaturalización



T_m: punto medio del perfil de desnaturalización térmica de ADN-ADN o de ADN-ARN

Figura 1- Análisis de ADN

Cuadro 7- Contenido de G+C en organismos

Animales y plantas superiores	**30-50% (promedio 40%)**
Microorganismos eucariotas:	muy variable
Algas	38-79
Protozoos	20-60
Mohos mucosos	20-40
Hongos	30-66
Procariotas:	25-80
Actinomyces	59-73
Bacillus	32-62
Escherichia	48-52
Pseudomonas	58-70
Salmonella	50-53

En general, el contenido de G+C de las cepas de una misma especie es bastante constante. Si dos organismos difieren en más del 10% en su contenido de G+C, sus genomas presentan secuencias de bases diferentes.

Este método debe complementarse con otros que evalúan los caracteres que apoyan a la taxonomía clásica, ya que aun con contenidos de bases similares, las secuencias de las bases pueden ser diferentes. A la inversa, *Staphylococcus* presenta un contenido de G+C de 30-38% y *Micrococcus* de 64 al 75%, sin embargo estos géneros de cocos Gram positivos tienen muchas características en común.

Hibridación de ácidos nucleicos, es la otra técnica muy empleada en los estudios taxonómicos. Si una mezcla de ADN monocatenario se enfría y se mantiene unos 25ºC debajo de la Tm, las cadenas con secuencias complementarias se reasociarán para formar una ADN de doble cadena estable, mientras que las cadenas no complementarias permanecerán sin aparearse. La incubación a 10-15ºC por debajo de la Tm permite que se formen híbridos sólo con cadenas prácticamente idénticas. Se emplean segmentos de ADN monocatenario radiactivos, de modo que luego de la hibridación se mide la radiactividad resultante que se expresa como % de la lograda con el ADN de referencia (100%).

Se considera que dos cepas cuyos ADN muestran al menos un 70% de similitud bajo condiciones de hibridación óptimas y menos de un 5% de diferencias en su Tm, son miembros de la misma especie. Estos criterios van cambiando a medida que las técnicas se perfeccionan.

Para organismos no tan relacionados se emplea la hibridación del ARN (ribosomal o de transferencia, radiactivo) con ADN. Se usan los ARN ya que los genes que codifican a estas moléculas no han evolucionado tan rápidamente como la mayoría de los genes microbianos.

Secuenciación de los ácidos nucleicos: las estructuras genómicas se comparan en la actualidad mediante la secuenciación del ADN y el ARN. La mayor atención se ha focalizado en la secuenciación de fracciones conservadas del ARN, como la 5S y 16S, aislados de las subunidades 50S y 30S de los ribosomas bacterianos.

En los estudios de evolución y parentesco microbianos se analizan mucho los ARN ribosomales ya que se encuentran en todos los organismos, su rol es también similar y su estructura se modifica muy lentamente debido precisamente a la importante función que desempeñan. Como contienen secuencias estables y variables, es posible comparar tanto microorganismos estrechamente relacionados como aquellos más alejados filogenéticamente.

La metodología escapa a los límites del texto pero incluye ruptura del ARN marcado con elementos radioactivos con ayuda de ribonuclasa, en fragmentos pequeños que se separan y secuencian por su composición en oligonucleótidos, que se comparan con ayuda de programas de computación y se calculan los coeficientes de asociación.

También se fabrica el ADN complementario con ayuda de la transcriptasa inversa. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) se amplifica ese ADN y se secuencia. Finalmente se deduce la secuencia del ARNr a partir de los resultados.

Actualmente la técnica está muy evolucionada y se han secuenciado genomas bacterianos completos como los de *Haemophilus influenzae* y *Micoplasma genitalium.* El del primero contiene 1.743 genes en 1.830.137 pares de bases y es mucho mayor que el genoma de un virus.

Filogenia bacteriana

La taxonomía bacteriana evoluciona muy rápidamente con los conocimientos sobre la biología de las bacterias, la aplicación de métodos moleculares al estudio de las relaciones filogenéticas entre grupos bacterianos, ayudados con importantes aplicaciones de las técnicas de la informática. El cuadro 8 resumen estos avances y el cuadro 9 presenta algunos de los segmentos de ácidos nucleicos empleados en estos estudios y la metodología aplicada.

Se considera que la similitud en moléculas implica similitud en los genes. Cuanto más reciente es el ancestro común, se encuentra mayor similitud y relaciones entre los microorganismos según la similitud en los genes. Se emplean técnicas de hibridación ADN-ADN y de comparación de genes específicos.

Cuadro 8- Filogenia bacteriana

* Es un método de clasificación que además plantea una hipótesis de evolución (determina relaciones de parentesco entre las especies)
* Compara secuencias de moléculas (cronómetros evolutivos) y establece las diferencias entre ellas
* Propiedades de un buen cronómetro evolutivo:
  - distribución universal en toda forma de vida celular
  - igual función en todos los organismos
  - cumplir una función celular central (replicación, transcripción, traducción)
  - secuencia altamente conservada para distancias evolutivas grandes
  - ausencia de transferencia horizontal (poco probable para funciones centrales)
  - cantidad de información suficiente (ser suficientemente grande)

Cuadro 9- Segmentos de ARN en procariotas usados en estudios filogenéticos

Nombre	Tamaño (nucleótidos)	Ubicación
5S	120	Subunidad mayor del ribosoma
16S	1500	Subunidad menor
23S	2900	Subunidad mayor

Secuencias de 16SrARN

Estructura primaria: mosaico de dominios que varían en términos del grado de conservación de la secuencia primaria de nucleótidos.
- Dominios de conservación universal
- Dominios de nivel intermedio de conservación, con cambios de secuencia, pero con conservación de la estructura secundaria
- Regiones altamente variables

Estructura secundaria:
similar en todos los organismos
acotada por su función
síntesis de proteínas: función ancestral

Metodología
– transcriptasa reversa
– *PCR*
– Secuencias de 16SrARN

El cuadro 10 resume algunas de las estructuras y/o funciones que se emplean en estudios filogenéticos dada su estabilidad genética y el cuadro 11 presenta las ventajas del análisis de la fracción 16S del r ARN.

Cuadro 10- Propiedades definidas genéticamente que han cambiado poco en bacterias

- Estructura de la pared celular: peptidoglicano presente solamente en bacterias coherentes filogenéticamente
- Lípidos de membrana (esteres o éteres)
- Fotosíntesis oxigénica: solo en Cianobacterias
- Metanogénesis: todas estas bacterias pertenecen a uno de los 4 linajes dentro de *Archaea*
- Originaron organismos no metanogénicos, pero el proceso surgió una sola vez

Arboles filogenéticos

Las relaciones filogenéticas se representan en diagramas ramificados o árboles, que son gráficos compuestos por ramas que se conectan en nudos (unidades taxonómicas como especies o géneros). Puede presentar raíz o estar desprovista de ella (figura 2). Los sin raíz representan simplemente relaciones evolutivas pero no brinda datos de vías evolutivas.

La figura 2a (Prescott *et al.*, 1999) muestra que el microorganismo A está más relacionado con C que con D y B, pero no da datos sobre un ancestro común ni direcciones de cambio. En b se muestra un árbol con raíz que presenta un nudo que sirve de antecesor común y muestra el desarrollo de las cuatro especies desde esta raíz.

Una pregunta que surgió tempranamente en estudios filogenéticos es por qué existen tantas diferencias entre los organismos procariotes (cuadro12).

Algunas explicaciones se basan en el hecho de que son los organismos más ancestrales, son muy ubicuistas, se encuentran en ambientes extremos, son parásitos o simbiontes de todos los *Eukarya* y representan la mayor diversidad de seres vivos, biodiversidad que aun no está completamente explorada.

Cuadro 11- Caracteres que confirman el árbol universal construido a partir del gen de la fracción 16S de la subunidad menor del rARN

- Principales características diferenciales entre dominios *Bacteria*, *Archae* y *Eukarya*
- Características de los procariotas actuales más cercanos al ancestro relacionadas con las condiciones fisicoquímicas en el origen de la vida
- Características de los *Eukarya* más cercanos a los procariotas: *Giardia* y *Microspiridia*
- Secuencias de otras moléculas, especialmente las ligadas a la replicación, transcripción y traducción.

Entre los *Archaea* se encuentran los termófilos extremos (incluidos termófilos acidófilos), los sulfatorreductores, metanogénicos y halófitos extremos.

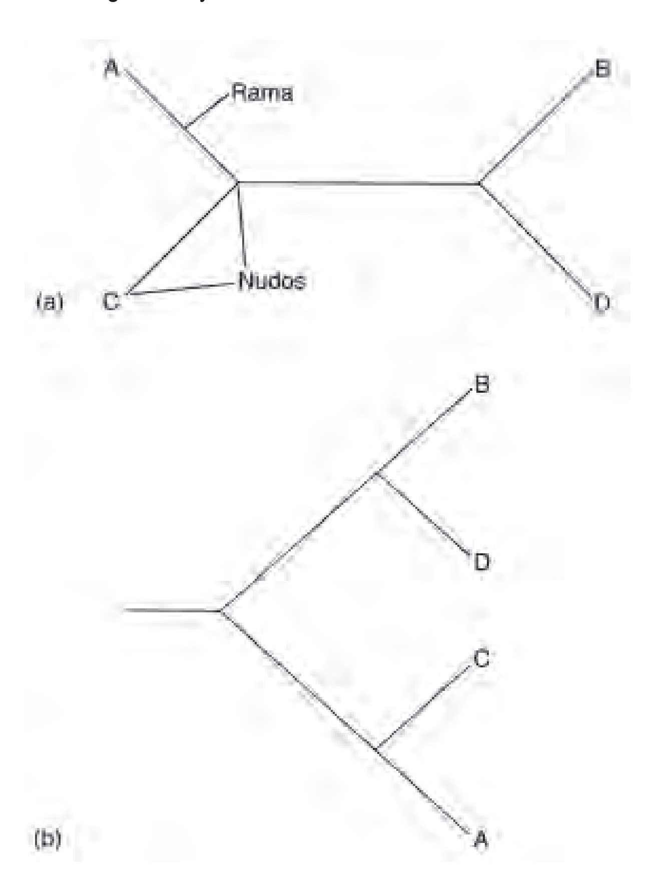


Figura 2- Arboles filogenéticos. a) sin raíz que une 4 unidades taxonómicas y b) con raíz

Cuadro 12- Comparación entre *Bacterias*, *Archaea* y *Eucarya*

Característica	*Bacteria*	*Archaea*	*Eucarya*
Peptidoglicano	si	no	no
Lípidos de la membrana	Enlaces éster	Enlaces eter	Enlaces éster
Ribososmas **+**ARN iniciador	70S formilmetionina	70S metionina	80S metionina
Intrones en ARNt	no	si	si
ARN polimerasa	Una (4 subunidades)	Varias (8-12 subunidades)	Tres (12-14 sub-unidades)
Ribosoma sensible a:			
Toxina diftérica	No	Sensible	Sensible
Cloranfenicol	Sensible	No	No
Kanamicina	”	”	”
Estreptomicina	”	”	”

Otras aproximaciones taxonómicas

La taxonomía numérica, es empleada desde 1957 para efectuar agrupamientos entre vegetales, animales y se extendió rápidamente al estudio de las bacterias y se caracteriza por:

- La agrupación de unidades taxonómicas o taxones por métodos numéricos
- Se basa en la determinación de un gran número de caracteres, todos ellos con el mismo peso relativo: flagelos, tipos de colonias, velocidad de crecimiento, pigmentos
- La similitud es función de la proporción de caracteres comunes

Ejemplo de aplicación de la taxonomía numérica en la comparación de dos cepas bacterianas por caracteres fenotípicos (determinación de un gran número de ellos).

Se determina el coeficiente de semejanza = $\frac{a + d}{a + b + c + d}$

a: número de caracteres **positivos** en ambas cepas
b: número de caracteres **positivos** sólo en cepa 1
c: número de caracteres **positivos** sólo en cepa 2
d: número de caracteres **negativos** en ambas cepas

Otra aproximación más moderna es la **taxonomía polifásica** que busca el consenso en la integración de distintos tipos de caracteres:

* Fenotípicos:
- clásicos (igual que en taxonomía clásica)
- marcadores quimiotaxonómicos (perfil de ácidos grasos, de proteínas, etc.)

* Genotípicos:
- clásicos: % G+C, hibridación DNA-DNA
- nuevos: perfiles moleculares por restricción o por amplificación

* Filogenéticos: basados en el reconocimiento del gen del fragmento 16S del rARN

Marcadores taxoquímicos: La detección y cuantificación de numerosas moléculas presentes en los microorganismos se han empleado mucho en estudios taxonómicos y filogenéticos a pesar de que requieren análisis químicos con equipamiento especializado, no son universales, pero resultan muy útiles dentro de algunos grupos y presentan alto grado de discriminación.

Estas moléculas están presentes en distintas estructuras celulares, como son:

* pared: la molécula del peptidoglicano se encuentra presente en todas las bacterias excepto los grupos Planctomyces y Mycoplamas
* membrana externa de la pared procariota: el análisis de sus lipopolisacáridos es muy usado en la actualidad
* membrana citoplasmatica: los ácidos grasos, acidos micólicos presentes en un grupo de bacterias Gram positivas (Actinomicetes), los pigmentos carotenoides de las bacterias fototrofas anoxigénicas
* cadena de transporte electronico: citocromos, quinonas
* sistema fotosintetico: bacterioclorofilas
* citoplasma: poliaminas en bacterias metanogénicas y Gram negativas, perfil proteico, perfil enzimático (*multilocus*).

En resumen: se han planteado algunas de las dificultades encontradas en el desarrollo de un árbol filogenético universal. Los mejores resultados se obtendrán si se emplean todos los datos posibles, tanto moleculares como fenotípicos, para el análisis (ejemplo en la taxonomía polifásica). La mayoría de los microbiólogos emplean árboles derivados de análisis de secuencias de la fracción 16S del ARN ribosomal. Pero es necesario tener en cuenta que estos árboles pueden cambiar a medida que se realicen y analicen nuevos datos.

Apéndice

La última edición del Manual Bergey

Ha habido un progreso considerable en el dominio de la taxonomía bacteriana desde 1984, fecha de la publicación del primer volumen del *Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology*. El número de especies descriptas se ha duplicado y hay más de 170 géneros nuevos, gracias a la secuenciación del ARN ribosomal, del ADN y de las proteínas.

La segunda edición del Manual Bergey (2001) es fundamentalmente filogenética en lugar de fénica (figura 3 y resumen en cuadro 13) (Prescott *et al.*, 1999).

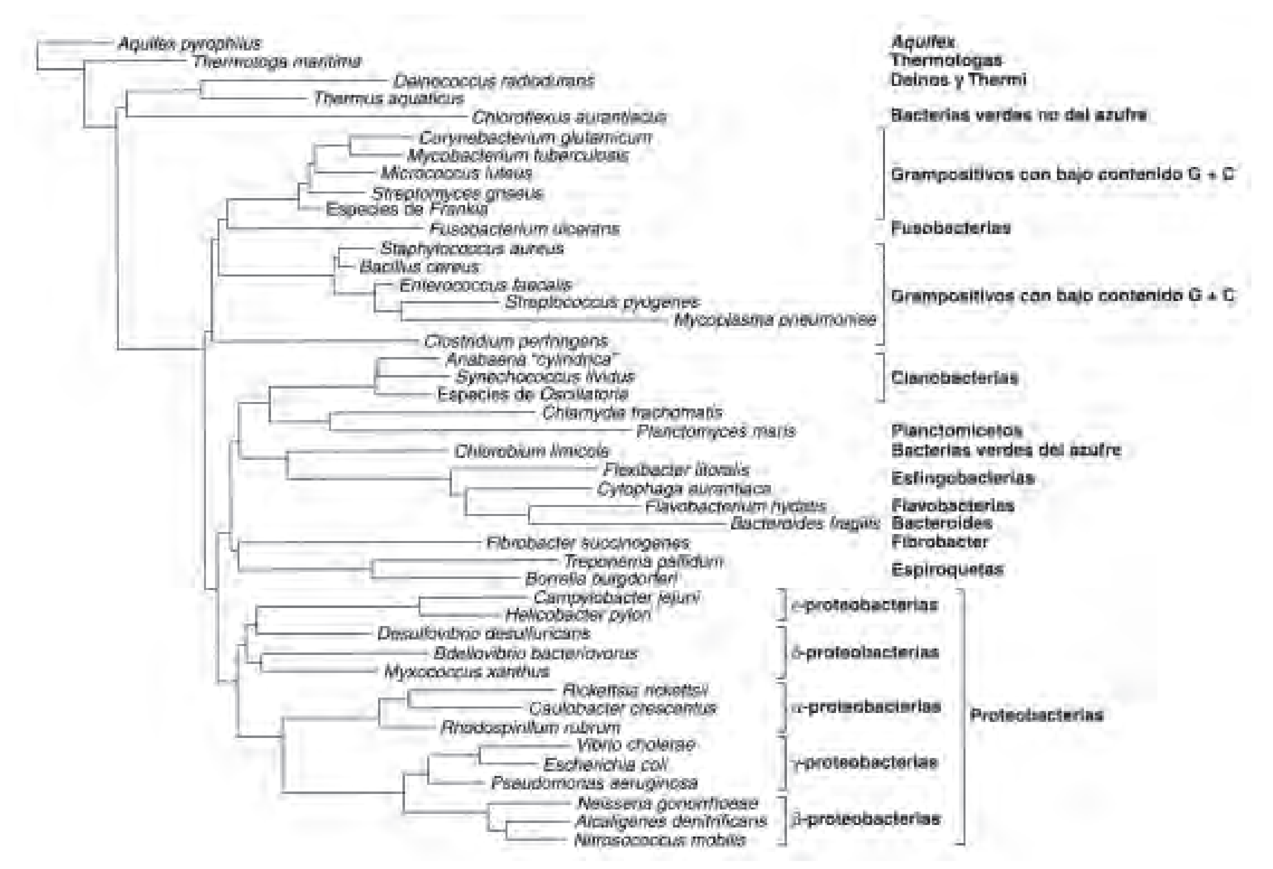


Figura 3- Filogenia en *Eubacteria*: árbol basado en comparaciones del segmento 16S del ARN ribosomal

Cuadro 13- Esquema de la organización del *Bergey Manual of Systematic Bacteriology* (2001)

Rango taxonómico y Sección	Géneros representativos
Volumen 1: Archaea, Cianobacterias, Protótrofos y géneros muy ramificados	
Archaea, reino: Crenarchacota	
13 Secciones. Algunas de ellas:	
Metanógenos	*Methanobacteruim*
Halobacterias	*Halobactium, Halococcus*
Géneros muy ramificados	
Eubacterias	
Sección XIII: Prochloron y Cianobacterias	*Prochloron, Oscillatoria, Anabaena, Nostoc*
Sección XIV: Chlorobia	*Chlorobium.*
Volumen 2: **Proteobacterias**	
Reino: Proteobacteria	*Rhodospirillum, Rickettsia, Cualobacter, Rhizobium,*
Sección XV: α-Proteobacteria	*Nitrobacter*, *Methylobacterium, Beijerinckia,Hyphomicrobium*.
Sección XVI: β-Proteobacteria	*Neisseria, Burckholderia, Alcaligenes, Nitrosomonas, Thibacillus*.
Sección XVII: γ-Proteobacteria	*Chromatium, Leucothrix, Pseudomonas, Azotobacter* *Vibrio, Escherichia, Klebsiella*, *Proteus, Salmonella, Shigella, Yersinia, Haemophilus.*
Sección XVIII: Δ-Proteobacteria	*Desulfovibrio, Bdellovibrio, Myxoccus, Heliobacter.*
Sección XIX: ¤- Proteobacteria	*Campylobacter, Helicobacter.*
Volumen 3: Grampositivas de bajo contenido en G*C	
Sección XX: *Clostridia* y afines	*Clostridium, Eubacterium, Desulfotomaculum, Veinonella,Haloanaerobium.*
Sección XXI: *Mollicutes*	*Micoplasma, Ureaplasma, Spiroplasma.*
Sección XXII: *Bacillus y Lactobacillus*	*Bacillus, Thermoactinomyces*, *Lactobacillus*, *Streptococus, Enterococcus*, *Listeria, Staphylococcus.*
Volumen 4: Grampositivos con alto contenido en G+C	
Sección XXIII: Clase Actinobacteria	*Actinomyces, Micrococcus, Arthrobacter*, *Corynobacterium, Mycobacterium*, *Nocardia*, *Actinoplanes, Propionibacterium*, *Streptomyces, Frankia, Bifidobacterium, Thermomonospora.*
Volumen 5: Plantomicetos, Espiroquetas, *Fibrobacter, Bacteroides y* Fusobacterias	*Planctomyces, Chlamydia*
Sección XXIV: Planctomicetes, Clamidias y afines	
Sección XXV: Espiroquetas	*Spirochaeta, Borrelia, Leptospira*
Sección XXVI: *Fibrobacter*	*Fibrobacter*
Sección XXVII: *Bacteroides*	*Bacteroirdes, Porphyromonas*, *Prevotella*
Sección XXVIII: Flavobacterias	*Flavobacterium*
Sección XXIX: Esfingobacterias, Flexibacterias y Cytophaga	*Sphingobacterium, Flexibacter*, *Cytophaga*
Sección XXX: Fusobacterias	*Fusobacterium.*

Los 5 tomos presentan mucha información ecológica y las especies patógenas se encuentras dispersas en los 5 volúmenes, en un ordenamiento filogenético. Un breve resumen incluye:

Volumen 1: *Archaea*, cianobacterias, prototrófos verdes y géneros muy ramificados.
Volumen 2: Proteobacterias
Volumen 3: Gram positivos con bajo contenido en G + C
Volumen 4: Gram positivos con alto contenido de G + C
Volumen 5: Plantomicetes, Espiroquetas, *Fibrobacter, Bacteroides*, y Fusobacterias.

Se incluye también en este volumen una sección que actualiza las descripciones y las relaciones filogenéticas revisadas desde la publicación del volumen 1.

Bibliografía

ASM **Methods for General and Molecular Bacteriology**, 1994.

Madigan, Martinko y Parker. **Brock**, **Biología de los microorganismos**, 2000. Prentice Hall International.

Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology, 2001.

Prescott, Harley y Klein, **Microbiología**, 1999 McGraw-Hill. Interamericana.

The prokaryotes, 2nd ed. 1992.

Preguntas de repaso

1) Resuma las ventajas de emplear las características morfológicas, fisiológicas/metabólicas, ecológicas, genéticas y moleculares, en la clasificación e identificación.
2) Se le presenta el caso de dilucidar si dos aislamientos de bacterias aisladas de nódulos de trébol son de la misma especie. ¿Qué caracteres les determinaría? ¿En qué momento usaría estudios de su ADN?
3) Conceptos de: taxonomía y filogenia.
4) ¿Qué se entiende por caracteres morfológicos? ¿Resultan más útiles en estudios taxonómicos de bacterias o de hongos? ¿Por qué?

5) Señale dos o tres caracteres fisiológicos o bioquímicos que aplicaría en el estudios de bacterias lácticas.
6) ¿Por qué se usan fragmentos de ARN en estudios filogenéticos?
7) ¿Qué importantes herramientas se emplean en estos estudios de análisis de ácidos nucleicos?
8) ¿Por qué el concepto de especie resulta algo flexible en el caso de bacterias?

7 Los protistas superiores

Este grupo comprende a un conjunto muy diverso de organismos cuyo estudio ha sido abordado por distintas disciplinas: Ficología, Micología y Protozoología. Esta diversificación se explica por el hecho de que los botánicos reconocieron a las algas y a los hongos como plantas y los zoólogos a los protozoos como animales. La característica común es la presencia de célula eucariota, son por lo tanto microorganismos eucariotas.

Actualmente se reconocen como microorganismos, organismos muy simples, que han permanecido a través de la evolución adaptándose a las condiciones modernas. Los representantes más especializados, como un alga de mar, un ciliado, un moho, pueden ser asignados rápidamente a las algas, protozoos y a los hongos, respectivamente. Sin embargo, existen numerosos protistas superiores incluidos arbitrariamente en algún grupo, como el caso del género *Euglena*, ubicado entre las algas y los protozoos.

En términos generales**:**
Las algas pueden definirse como organismos con fotosíntesis oxigénica y que poseen cloroplastos. Pueden ser unicelulares, filamentosas o cenocíticas, algunas poseen aspecto de planta debido al extensivo desarrollo multicelular, pero no se diferencian en tejidos ni órganos; por lo general la especialización celular se da en el caso de la reproducción. No deben confundirse con las cianobacterias, que también realizan fotosíntesis oxigénica, pero que son bacterias y evolucionaron como ellas.

Los protozoos y los hongos son organismos no fotosintéticos y la diferencia entre ellos es de carácter estructural; los protozoos son predominantemente unicelulares y los hongos, sobre todo cenocíticos, se desarrollan dando origen a una estructura filamentosa y ramificada, el **micelio**.

El **cloroplasto** es el organelo clave en las relaciones entre los tres grupos. Se puede perder irreversiblemente, dando origen a las algas incoloras o **leucocitos,** que se desarrollan con nutrientes minerales simples, a la luz. Así, a partir de algas unicelulares, es fácil distinguir formas que dependen de procesos fermentativos o respiratorios para su nutrición, como los protozoos.

La separación es muy marcada entre algas y protozoos en estructura celular y fisiología, pero a los evolucionistas les resulta más difícil vincular a los protozoos con los hongos: los primeros son uniformemente unicelulares y móviles y los hongos predominantemente cenocíticos e inmóviles, y su hábitat fundamental es el suelo. No obstante, es necesario recordar que las formas primitivas son acuáticas y poseen esporas flageladas (zoosporas). Para los hongos del suelo, el viento es la principal forma de propagación.

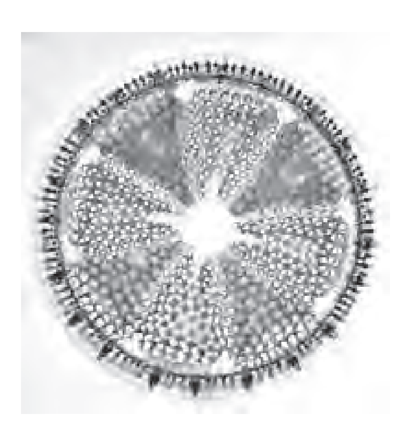
Las algas

El suelo no es un hábitat óptimo para las algas (figura 1), que prefieren los ambientes acuáticos. Sin embargo, la ficoflora terrestre está integrada por numerosas especies unicelulares y filamentosas, cuya distribución está ligada a tipos pedológicos y a la cubierta vegetal. En condiciones extremas, estos **productores primarios** (**PP**) de materia orgánica pueden desempeñar un rol fundamental. La taxonomía que se emplea es la de los botánicos (Talofitas*)* y se basa en propiedades celulares:

- naturaleza química de la pared, si está presente
- los materiales orgánicos de reserva
- la naturaleza de los pigmentos fotosintéticos
- la naturaleza y posición de los flagelos, en el caso de algas móviles
- estructuras reproductoras

El cuadro 1 muestra las divisiones de las algas.

Las divisiones no son equivalentes en lo relacionado al rango de estructura de sus integrantes. Por ejemplo, *Euglenophyta* consiste enteramente en organismos unicelulares organizados en colonias simples, mientras que las *Phaeophyta* (algas pardas) son enteramente organismos multicelulares, de aspecto de planta. El mayor y más variado grupo es el de las algas verdes (*Chlorophyta*), de los cuales se originaron probablemente las plantas, incluye organismos unicelulares y hasta multicelulares con aspecto de vegetal.



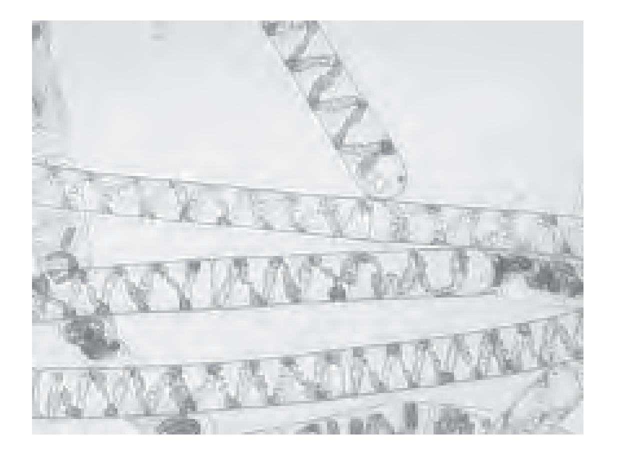


Figura 1- Algas unicelulares y filamentosas

Cuadro 1- Principales grupos de algas

Grupo	Características de los pigmentos, pared celular, materiales de reserva, nº y tipos de flagelos, organización celular
Chlorophyta algas verdes	clorofila a y b, celulosa, almidón, 2 flagelos, unicelulares filamentosas, de gran tamaño
Euglenophyta euglenoides fotosintéticos	a y b, sin pared, paramilón y grasas, 1, 2, 3 flagelos por célula, unicelulares
Phyrrophyta dinoflagelados	a y c y carotenoides especiales, celulosa, almidón y aceites, 2 flagelos diferentes en forma y posición, la mayoría unicelulares, pocas filamentosas
Chrysophyta Algas amarillo-verdosas, diatomeas	a+/-c y carotenoides especiales, 2 mitades superpuestas de sílice, otras sin pared, aceites, 2 flagelos por célula, unicelulares, filamentosas, cenocíticas
Phaeophyta algas pardas, dinoflagelados	a y c, carotenoides especiales, celulosa y algina, grasas y luminarina, 2 flagelos de distinta longitud, pluricelulares
Rhodophyta algas rojas (Plantae)	a, ficobilinas, celulosa, almidón, s/flagelos, unicelulares, pluricelulares con forma de planta

Es muy extensa la laguna biológica que existe entre las cianobacterias y las algas. En cambio, las plantas superiores presentan relación con las algas verdes: la disposición específica de los pigmentos en el cloroplasto, las paredes celulares con celulosa y la capacidad de almacenar almidón.

La mayoría de las algas multicelulares son inmóviles en estado maduro. Sin embargo en su reproducción, frecuentemente se forman esporas móviles, ya sea asexuales (zoosporas) o gametos, lo que revela su relación con algún grupo particular de flagelados unicelulares.

Varias divisiones de algas poseen miembros unicelulares inmóviles o que se desplazan por mecanismos diferentes a los flagelos. Los **desmidios**, miembros de las *Chlorophyta*, presentan células grandes, aplanadas, con simetría

bilateral. Las **diatomeas** (*Chrysophyta*) poseen paredes orgánicas impregnadas con sílice, de arquitectura muy compleja, con dos valvas superpuestas como las de una caja de Petri. La división es longitudinal, cada célula hija retiene la mitad de la vieja pared y sintetiza una nueva mitad.

A pesar de carecer de flagelos, estos organismos pueden moverse lentamente sobre sustratos sólidos. El mecanismo en los desmidios no se conoce y en las diatomeas la locomoción se realiza por modificación del movimiento ameboide. Poseen un orificio en la pared, el **rafe**, a través del cual el protoplasma se adhiere al sustrato, empujando a la célula. Grandes depósitos de paredes de diatomeas se han acumulado y se usan como abrasivos y en filtros.

Distribución de las algas

La mayoría son organismos acuáticos, en donde habitan en vida libre o asociadas simbióticamente con invertebrados, como esponjas, corales, larvas, en cuyas células crecen. En el suelo, su número es inferior al de las bacterias, actinomicetes u hongos. Es precisamente su bajo número, su nutrición autotrófica y su dependencia frente a la luz, humedad y nutrientes minerales, que hicieron pensar a los microbiólogos que su rol en los ecosistemas agrícolas no era muy significativo.

Su desarrollo es visible a simple vista en la superficie de suelos vírgenes o cultivados y su aislamiento es sencillo en medio líquido, con sales minerales, a la luz. El enriquecimiento se puede seguir por el color de los pigmentos. Los recuentos en suelos superficiales pueden variar desde algunos miles a millones/gramo (biomasa entre 20-40 kg/ha). Valores más altos se encuentran por períodos breves, luego de una lluvia.

Nutrición

- **fototrófas**, la fotosíntesis es el mecanismo principal de obtención de energía. Algunas especies requieren vitaminas y en la naturaleza son las bacterias las que proveen estos factores de crecimiento. Muchas algas tienen un tipo mixto de metabolismo, pudiendo emplear fuentes orgánicas. Aun en la luz, ciertas algas no pueden emplear CO_2 como su principal fuente de carbono y dependen de acetato u otras formas orgánicas. Este hecho es causado por un defecto en la maquinaria fotosintética; si bien pueden obtener energía de su actividad fotosintética, no pueden obtener el poder reductor para convertir el CO_2 en materiales celulares.
- **osmotrófas,** muchas algas que realizan fotosíntesis normal en la luz, pueden crecer en la oscuridad a expensas de variedad de compuestos orgánicos, derivando su metabolismo hacia la respiración. Las algas completamente encerradas en pared celular dependen exclusivamente de sustratos orgánicos disueltos en la oscuridad
- **fagotrófas,** aquellas células desprovistas de pared o que no están completamente encerradas en ella, pueden predar bacterias u otros microorganismos.

No es correcto, entonces, describir a las algas como grupo exclusivamente fotosintético, ya que muchos de sus miembros unicelulares poseen las características nutricionales de los protozoos y de los hongos. Los **leucofitos** que se forman por la pérdida irreversible del cloroplasto, son organismos no pigmentados derivados de grupos flagelados, de diatomeas y de formas inmóviles de las algas verdes unicelulares. No pueden fotosintetizar.

En el laboratorio, esta transición pudo ser demostrada experimentalmente, en ciertas cepas de *Euglena*, al ser tratadas con estreptomicina o cuando son expuestas a pequeñas dosis de luz ultravioleta o a altas temperaturas. La clasificación de los leucofitos es un problema difícil: por su estructura pueden ser asignados a una división particular de algas, como representantes no fotosintéticos. Pero como son eucariotas unicelulares no fotosintéticos, pueden ser mirados como protozoos, y son incluidos entre ellos por los zoólogos. Constituyen un grupo de transición entre las algas y los protozoos.

Ecología

Los principales factores que inciden en la distribución de las algas en el suelo son: **la humedad, los nutrientes minerales, el CO_2 y la luz**. El CO_2 y los elementos nutritivos no son limitantes. La **luz** determina la distribución de los organismos fototrofos: las algas son más numerosas en los 5-10 cm del perfil y disminuyen marcadamente con la profundidad. Se pueden encontrar en horizontes más profundos (10^3/g) llevadas por las prácticas culturales (arrastre mecánico), por la fauna o el agua (nutrición heterótrofa o permanecen en estado latente).

En ambientes con **insolación muy intensa**, las algas tienden a concentrarse algunos centímetros debajo de la superficie. Allí se protegen debajo de minerales translúcidos como cuarzo o dolomita, de las radiaciones solares y de la desecación (sobre todo la ficoflora de los desiertos) y contra el frío intenso en las regiones polares. Las radiaciones ultravioleta no son perjudiciales, de modo que son empleadas en su aislamiento, eliminando los contaminantes bacterianos.

La **humedad**: las algas verdes son muy exigentes en agua y a medida que aumenta la aridez, el número de especies y su densidad disminuyen. Otras algas, por el contrario, soportan mal la inundación. El óptimo se sitúa, como para otros grupos de microorganismos, alrededor del 40-60% de la capacidad de campo. En la superficie de suelos agrícolas de la zona templada, la disponibilidad de agua para las algas suele ser limitante. Las células se recubren de capa muscilaginosa muy higroscópica que puede retener 10-15 veces su volumen en agua, la que es perdida muy lentamente.

El efecto de la **estación** del año es marcado, en primavera su número es bajo; el congelamiento las perjudica y en invierno la población declina.
El efecto del **pH** varía con el tipo de suelo; en general las algas son poco sensibles a las variaciones de pH. Los valores próximos a la neutralidad o ligeramente alcalinos, son más favorables. En suelos ácidos dominan las clorofíceas, que se pueden encontrar a pH 5,0 y aun 4,0 (el óptimo para su desarrollo se sitúa entre pH 6,8 y 8,5), aunque se encuentran en pH 9,3-10 y toleran hasta pH 13.

Antagonismos: muchas especies son susceptibles al ataque por bacterias, hongos, estreptomices, que con enzimas específicas destruyen la pared celular. Otros antagonismos ocurren con nemátodos, termites.

Funciones

- **Aporte de materia orgánica**, ya que son **productores primarios** muy importantes en suelos desnudos, pobres, erosionados, quemados, salinos o desérticos. Los **líquenes** (asociación alga-hongo) constituyen el estado inicial de vegetación sobre rocas o suelos minerales. El componente fotosintético puede ser también una cianobacteria, incluso fijadora de nitrógeno, con lo cual estos líquenes pueden ser fijadores de N_2.
- **Meteorización de rocas**: una fina capa de células de algas recubre las rocas, y a la muerte de las algas, esta materia orgánica posibilita el desarrollo de bacterias y ocasionalmente de hongos (los colonizadores secundarios). La meteorización parece ser favorecida por la formación de bicarbonatos (del CO_2 de la respiración) o por metabolitos de los microorganismos heterótrofos y de los líquenes.
- **Fijación del suelo**: en suelos minerales sin estructura, las costras de líquenes y algas, fijan el suelo, retardando la erosión y modificando el régimen hídrico. Se reduce la evaporación y los muscílagos contribuyen a aumentar la estabilidad estructural.
- **Liberación de oxígeno**: por su fotosíntesis oxigénica aumentan la aireación en suelos inundados de arrozales y en suelos pesados. Por el consumo del CO_2 y la liberación de sustancias alcalinas, tienden a elevar el pH combatiendo la acidez. Liberan vitaminas, auxinas, que favorecen a los cultivos así como sustancias inhibidoras sobre parte de la microflora del suelo.
- **Toxicidad:** son conocidas las floraciones de algas tóxicas que matan peces y contaminan aguas. Se debe a un desarrollo explosivo de dinoflagelados que liberan una poderosa neurotoxina, llamada saxitoxina. Los moluscos que se alimentan de estos dinoflagelados no pueden ingerirse.

Los protozoarios

Constituyen un grupo muy heterogéneo de eucariotas, unicelulares y móviles, cuyo tamaño varía entre algunas micras hasta algunos centímetros (figura 2) (Madigan *et al*, 2000) y (figura 3). Los habitantes del suelo son de talla más pequeña y aplanados, ya que deben moverse en el film de agua que llena los poros. Presentan semejanzas con varias divisiones de algas de las cuales derivan. Los varios tipos de leucofitos proveen de pruebas sobre el origen evolucionario de muchos grupos de protozoos. La pérdida de la capacidad fotosintética reduce abruptamente la potenciabilidad nutricional y es seguida de una serie de eventos a nivel celular que posibilitan al organismo el desarrollo de nuevos mecanismos de nutrición osmotrófico o fagotró-

fico. Estos cambios pueden impedir el reconocimiento del origen algal de estos microorganismos, los que se ubican entonces, entre los protozoos.

El **ciclo de vida** de estos organismos consiste en una fase activa y una fase de reposo o **cística**, en la que el organismo segrega una espesa capa protectora, pudiendo resistir por muchos años en ambientes adversos. La reproducción es usualmente por fisión longitudinal o transversal. Unas pocas especies poseen reproducción sexual. La clasificación de los protozoarios ha variado mucho en los últimos años y en los esquemas moleculares de clasificación reciente no existen los protozoos como taxón independiente y se encuentran eucariotas análogos a protozoos en todos los niveles evolutivos.

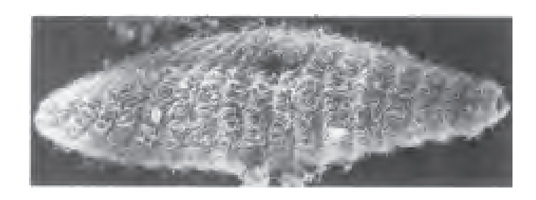


Figura 2- Protozoo ciliado

Los protozoarios de la clase *Mastigophora p*oseen 1 a 4 flagelos. En el suelo poseen pequeña talla (5-20 micras) y son los más abundantes (3.000 a 200.000/g de suelo) y los géneros más comunes son: *Allation, Bodo, Cercobodo, Cercomonas, Entosiphon, Heteromita, Monas* y los con clorofila *Euglena y Chlamydomonas.*

Los *Sarcodina o Rhizopoda* emiten seudópodos que facilitan su desplazamiento y por lo tanto la célula cambia constantemente de forma. Algunos poseen una envoltura rígida pero con orificio para emisión de los seudópodos. Los géneros más comunes en el suelo son: *Amaeba, Biomyxa, Englypha, Hartmanella, Lecytium, Naegleria, Trinema, Nuclearia.*

Los ciliados se mueven por numerosos apéndices (cilias). Las especies terrestres son también menores que las acuáticas (10 a 80 micras) y los géneros más comunes son: *Balantiophorus, Colpidium, Colpoda, Enchelys, Halteria, Pleurotricha, Tetrahymena, Vorticella.*

Nutrición

Se distinguen tres formas de nutrición:

Cuadro 2- Características de los principales grupos del subreino Protozoa

Grupo taxonómico	características	ejemplos
Mastigophora (flagelados)	Uno o más flagelos, división por fisión binaria longitudinal, reproducción sexual en algunos. Formas ameboides	*Trypanosoma, Giarda, Trichomonas*
Euglenoides (grupo también considerado con las algas)	Flagelados fototróficos	*Euglena*
Sarcodina (amebas)	Seudópodos, son frecuentes los caparazones, flagelos, en la etapa reproductiva	*Amoeba, Entamoeba*
Ciliophora (ciliados)	Cilias simples o compuestas. Dos tipos de núcleos, vacuola contráctil, fisión binaria transversal, sexualidad por conjugación. De vida libre, muchos comensales, algunos parásitos	*Tetrahymena, Paramecium, Vorticella, Didinium*
Apicomplexa (parásitos)	Esporas en su ciclo sexual, con cistos, sin cilias, se llaman a menudo esporozoos	*Plasmodium, Toxoplasma*

a. **Fotosintéticos**: son los *Phytomastigophora,* con pigmentos clorofilianos difusos o localizados.

Su importancia práctica es muy limitada, el género más extendido es *Euglena* y su aislamiento se realiza en los medios para algas y en muchas clasificaciones se reconocen como tales.

b. **Saprofitos**: su nutrición depende de la provisión de sustancias orgánicas solubles (osmotróficos); incluyen a los flagelados y a algunos ciliados. Se pueden desarrollar en medios sintéticos con peptona, glúcidos, aminoácidos o con extracto de suelo.

c. **Holozoicos**: representan sobre todo a los ciliados; se nutren por ingestión de partículas sólidas (fagotróficos) y otros microorganismos: bacterias, levaduras, algas, e incluso algunos protozoos. Es una de las formas predominantes de nutrición en el suelo. Muchas células bacterianas deben ingerirse en cada división celular. *Sarcodina* requiere cerca de 40.000 células bacterianas/división. La bacteria debe multiplicarse rápidamente para no ser eliminada por los predatores.

El significado en el suelo del modo de vida saprofita es desconocido; los protozoos no se destacan en las transformaciones de la materia orgánica. Se considera que el modo dominante de nutrición es la fagocitosis, sobretodo entre los **ciliados** que representan la máxima diferenciación a nivel celular, y al mismo tiempo es un grupo evolucionario terminal. En efecto, el desarrollo de un sistema biológico más complejo ocurre con el establecimiento de

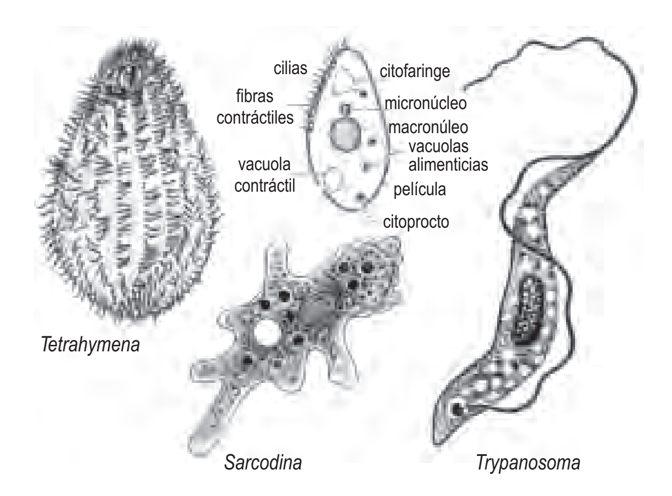


Figura 3- Representantes de tres clases de protozoos

pluricelularidad, e involucra la diferenciación de células en el desarrollo del organismo (animales o vegetales).

Los protozoos del **rumen** cumplen un rol muy importante contribuyendo a la degradación de sustancias orgánicas, como la celulosa, liberando ácidos grasos volátiles que son absorbidos por el animal (capítulo 18).

Influencias del ambiente

Uno de los factores que limita el desarrollo de este grupo en el suelo es la distribución discontinua de la **materia orgánica y de la microflora** (nutrientes para los protozoos) en la solución del suelo dentro de los poros. El pequeño tamaño de muchos puede reflejar esta deficiencia nutricional.

La mayoría de los protozoos son **cosmopolitas**, distribuidos en todos los suelos del mundo, y es difícil correlacionar su presencia con áreas geográficas particulares. Se los encuentra en suelos de zonas árticas, templadas o tropicales. En suelos agrícolas el máximo número se encontró a los 10-12 cm y pocas especies llegan al subsuelo. Los nutrientes que favorecen el desarrollo de las bacterias, constituyen los factores más importantes en la distribución de los protozoos. Su biomasa en bosques y pasturas de la región fría puede llegar a 20 g/m^2, pero en zona templada no supera a los 5 g/m^2. La humedad es uno de los principales factores ecológicos, esencial para su proliferación, su fisiología y desplazamientos, pero pueden resistir la desecación enquistándose.

En general, su metabolismo es **aerobio**, pero hay especies que soportan concentraciones bajas de oxígeno y aun la anaerobiosis (por ejemplo, los patógenos del hombre y animales y los del rumen).

El **pH** del suelo afecta poco el espectro de especies, los hay en ambientes ácidos y también en extremos alcalinos.

Existe evidencia de **predación** por parte de hongos filamentosos sobre amebas y de otros organismos que pueden parasitar a los protozoos, pero su rol en la naturaleza, contribuyendo a la declinación de este grupo, no está claramente establecido.

Rol en el suelo

- **Limitación en el número de bacterias**, se han realizado experiencias con modelos simplificados: suelo estéril con protozoos y con bacterias y protozoos conjuntamente. Se demostró que la densidad bacteriana disminuye en presencia de protozoos. Se pensó que este hecho traería aparejada una disminución en la fertilidad del suelo, por disminución de la actividad biológica. Esta idea no es mantenida actualmente, sino que más bien se piensa que la destrucción de una parte de la población bacteriana estimula la actividad metabólica de los sobrevivientes, que compensarían la pérdida del resto de la población.
  Una de las hipótesis más aceptada postula un rejuvenecimiento celular, con síntesis de sustancias estimulantes para las poblaciones de bacterias que resisten a la predación.

- **Diseminación de esporas fúngicas**, ya que muchos son incapaces de digerirlas y las transportan en su superficie.

Su rol efectivo en el suelo es entonces difícil de determinar: tienen poco efecto en las etapas de mineralización e inmovilización de la materia orgánica. Muchas especies son parásitas del hombre, aunque no encuentran en el suelo ambiente apropiado.

Los hongos

Comprenden un grupo muy amplio de protistas superiores, incluidos por los botánicos entre las Talofitas (vegetales, sin clorofila) (figura 4).

Los principales grupos se reconocen como: mohos, levaduras y setas. Son todos heterótrofos y representan la última etapa en la escala de evolución de los protistas; su hábitat más frecuente es el suelo, aunque los hongos más primitivos son acuáticos.

El talo está constituido por el micelio (figura 5) –agregado de hifas filiformes– con tubos de paredes delgadas que envuelven a la masa citoplasmática continua (micelio cenocítico) y con tabiques (micelio tabicado) aunque en este caso existe continuidad citoplasmática por poros de comunicación.

Por su función se distinguen las hifas:

- **vegetativas,** que penetran a los sustratos para absorber los nutrientes
- **fértiles**, que dan origen a estructuras de fructificación.

Los hongos primitivos tienen semejanzas con los protozoos flagelados, que luego han evolucionado a estructuras biológicas distintas, adaptadas al suelo. Su desarrollo está sólo limitado por la disponibilidad de nutrientes, pudiendo llegar en los *Basidiomycetes* hasta 10m de radio.

Estructuras de resistencia: en condiciones desfavorables para la subsistencia o cuando los parásitos rodean al organismo, aparecen estas estructuras especializadas:

- **esclerocios**: bien delimitados, de corteza oscura, según el grado de cutinización, conjunto apretado de hifas con materiales de reserva. En condiciones favorables, entran en germinación dando origen a fructificaciones de menor tamaño: son los bulbillos (menos de 1 mm) y menos cutinizados.

- **clamidosporas:** elementos asexuados, de paredes gruesas, con materiales de reserva. Pueden presentarse intercalares, laterales o terminales, de alto contenido lipídico, de forma y tamaño diverso (esporas asexuadas).

Estructuras de fijación: estolones y apresorios, el estolón es una hifa aérea que se extiende a gran distancia, luego por su peso se curva, encuentra un soporte con el cual se pone en contacto y se convierte en órgano de fijación más complicado, el apresorio, unido firmemente al sustrato.

Haustorios: los hongos parásitos y simbióticos que penetran en las células vegetales aumentan la superficie de absorción, por ramificación de las hifas. Su rol es muy importante en las micorrizas, asociaciones simbióticas entre raíces y hongos. También se los llama **arbúsculos** (capítulo 16).





Figura 4- *Boletus appendiculatus* (arriba) y *Pleurotus* sp. (abajo)

Resumiendo: las estructuras de resistencia incluyen a los conidios (esporas asexuadas externas), clamidosporas y esclerocios, las oosporas (sexuadas), los esporangios y esporangiosporas, ascosporas y los rizomorfos. Los conidios de muchas especies son de vida breve y pierden viabilidad rápidamente cuando se forman o penetran en el suelo (caso de los patógenos) resultando difícil reaislarlos luego de algunas semanas. Otras especies poseen conidios muy resistentes,pudiendo permanecer en suelo seco mucho tiempo y germinar cuando este se rehumedece. Algunas especies requieren para germinar sustancias orgánicas o excreciones radicales.Este hecho tiene importancia en los hongos patógenos cuyas clamidosporas pueden sobrevivir hasta épocas favorables (*Fusarium, Phytosphtora*). Los esclerocios tienen un rol similar.

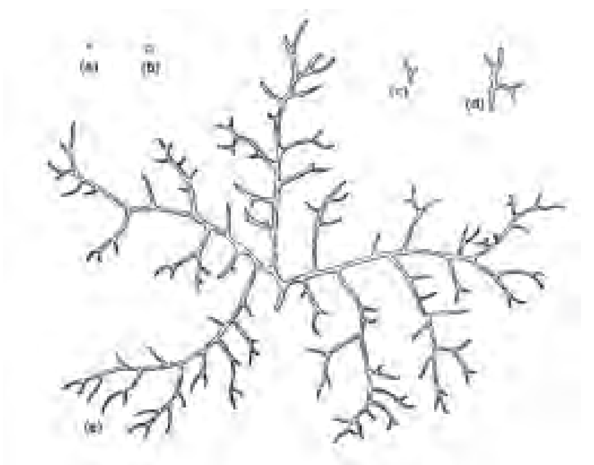


Figura 5 - Formación de micelio a partir de una espora

Las oosporas de *Phytium* permanecen en el suelo más de 16 meses y se producen sólo en contadas ocasiones por los hongos. Hay evidencia de que gran número de hongos surgen de esporas durmientes (ascosporas), que son activadas por el calor. Ciertas sustancias previenen la germinación de conidios y otros tipos de esporas, fenómeno conocido como **fungiostasis.**

En general, la espora germina cuando se libera algún tipo de materia orgánica en su vecindad. La fungiostasis depende también de la densidad de esporas. Entre los agentes antifúngicos, se cita el amonio en suelos alcalinos, los taninos del mantillo, el aluminio. Por este fenómeno la espora queda protegida, pues si germina en condiciones desfavorables para su nutrición y desarrollo, es fácilmente atacada por otros microorganismos.

Muchos hongos se protegen de la lisis provocada por enzimas liberadas por otros microorganismos, mediante la producción de pigmentos oscuros, del tipo de las **melaninas** y con polisacáridos formados por azúcares resistentes a la degradación.

Fisiología y nutrición

Se reconocen tres categorías de hongos por su relación con la materia orgánica:

- **saprófitos**, utilizan los sustratos orgánicos inanimados
- **parásitos** atacan organismos vivos
- **simbióticos,** asociados con otros organismos: alga o vegetal, para su nutrición

Las fuentes de **carbono** son variables, emplean de preferencia azúcares, almidón y algunos celulosa y lignina. Con respecto al nitrógeno, asimilan formas minerales y/o orgánicas (las últimas de preferencia). Almacenan glucógeno y aceite. Especies de *Penicillum* (moho verde) y de *Rhizopus* (moho negro) se desarrollan sobre cualquier tipo de sustrato húmedo (aun en el refrigerador a 5ºC); otros utilizan sustratos más específicos, encontrándose en el extremo de la escala a los parásitos obligados, que requieren determinada variedad vegetal.

Habitat

Los hongos están muy distribuidos en todos los ecosistemas, desde 0 a 25ºC, aunque pocos a 0ºC y con un máximo de 50ºC. Para los hongos del suelo el óptimo se ubica entre **20-30ºC,** en pH muy variados: el óptimo para el grupo estaría en la vecindad de **pH 6** y **dominan en ambientes ácidos**, por falta de competencia por parte de las bacterias. La luz es esencial para la esporulación de muchas especies y para la dispersión de esporas fototróficas. Las esporas permiten una amplia distribución. Como grupo son **aerobios** pero algunos soportan la anaerobiosis (los patógenos).

Su **rol** es muy variado, desde la degradación de moléculas orgánicas muy complejas hasta la formación de humus.

Métodos de estudio: se emplean numerosas técnicas, pero ninguna puede englobar a todas las especies presentes ni a su biomasa. El más empleado es el recuento en caja a partir de suspensiones-diluciones de suelo. Acidificando el medio con ácidos orgánicos débiles (pH 4,2) o con el uso de agentes bacteriostáticos (penicilina, novobiocina, rosa de Bengala, estreptomicina) se elimina la competencia de las bacterias. El problema radica en que el hongo puede reproducirse a partir de fragmentos de micelio, y de esporas (asexuadas o sexuadas). Una sola pieza de micelio puede disgregarse en la agitación en innumerables porciones, cada una de las cuales dará origen a una colonia. Resulta así muy fácil aislar especies de *Penicillum o Aspergillus* que esporulan profusamente. Los recuentos en caja deben ser tomados con precaución. La **microscopía fluorescente** ayuda mucho en la visualización en el suelo. Los datos obtenidos por el empleo de distintas técnicas varían mucho. Por recuentos en medio sólido se tienen datos desde 20.000 hasta 10^6 o más propágulos (hifas, esporas, fragmentos de hifas capaces de dar una colonia), por gramo de suelo seco.

La **biomasa** puede ser mayor que la de las bacterias y su micelio se puede extender 10-100 m/g de suelo superficial. Valores hasta de 500 a 1000 m (500-5.000 kg/ha) han sido citados, aunque muchas de las hifas pueden estar vacías (no viables). Los colorantes como el acetato de fluoresceína, que fluorescen por acción enzimática, son muy empleados para evaluar los metros de micelio fúngico viable/g de suelo, así como esporas viables para ser empleadas en inoculantes.

Reproducción

Reproducción asexual

Llamada también somática se realiza por fragmentación del talo, por fisión binaria y gemación (caso de las levaduras) y por producción de esporas. No incluye unión de núcleos y es la forma más frecuente de reproducción. El número, disposición, forma, color y origen de las esporas son característicos de las especies.

Por el lugar en donde se originan, se distinguen las:

1. **Talosporas** , se forman en filamentos miceliales, no son caducas:
   - **artrosporas**: se producen por desarticulación de la lámina media, los tabiques luego se gelifican simultáneamente y los distintos filamentos se separan y se redondean.
   - **blastosporas**: se forman por brotación de elementos preexistentes, se pueden separar y luego brotar; la separación se efectúa por constricción del istmo y no del tabique (micelio levaduriforme).
   - **dictiosporas**: son esporas pluricelulares, de más de 50 células, con apariencia reticulada.

2. **Fialosporas,** se originan en fructificaciones asexuadas bien definidas, son caducas y externas (terminales o laterales).

Se distinguen las **esporangiosporas**, originadas dentro de estructuras especiales, el esporangio, como en *Rhizopus, Mucor* y los **conidios** que se originan en extremos de las hifas (externas) o bien lateralmente.

Los conidios pueden encontrarse en estructuras especiales (acérvula, esporodoquio) que los protegen dentro de tejidos vegetales (se dan en general en hongos patógenos).

Reproducción sexual

Comprende las tres etapas fundamentales:

- **plasmogamia** (unión de dos protoplastos y los núcleos haploides)
- **cariogamia** (formación de un zigote diploide)
- **división meiótica** (reducción cromosómica).

Los hongos se dividen por su **sexualidad** en:

- **hermafroditas** (órganos + y - en el mismo talo)
- **dioicos** (en talos distintos)
- **indiferenciados** (no se diferencian los sexos).

Por su **compatibilidad** en:

- **homotálico,** cada talo es sexualmente autofértil y se puede reproducir por sí mismo
- **heterotálicos**, que requieren la ayuda de otro talo compatible.

La **reproducción sexual** puede ser:

- **heterogámica**, con gametos morfológicamente diferentes **y homotálicos** (autofértil)
- **isogámica** (gametos iguales) y **heterotálica** (ubicados en talos distintos).

Taxonomía

Los criterios empleados en la clasificación de este grupo heterogéneo incluyen caracteres morfológicos casi exclusivamente:

- **naturaleza del micelio** (tabicado o no)
- **tipo de reproducción sexual**
- **naturaleza de las esporas asexuadas** (internas en gametangio) y externas (conidios) (cuadro 3 y figura 6).

Cuadro 3- Taxonomía de los hongos

División	Subdivisión	Clase
Mixomycota (hongos sin pared)	Mixomycotina	*Acrasiomycetes* (mohos muscilaginosos unicelulares) *Plasmodiophoromycetes* (parásitos)
Eumycota (hongos con pared)	Mastigomycotina (esporas asexuales flageladas)	*Chrytridiomycetes* *Oomycetes* (antiguos *Phycomycetes*)
	Zygomycotina (miceliales, cenocíticos, esporas asexuales en esporangio)	*Zygomycetes*, por lo general saprofitas *Trichomycetes* (parásitos en intestino de artrópodos)
	Ascomycotina (micelio septado o levaduras, esporas asexuales no se forman en esporangio, esporas sexuales en ascas	*Hemiascomycetes*, levaduras o miceliales, asca no encerrada en ascocarpo *Euascomycetes*: miceliales, ascas en ascocarpo
Hemiascomycetidae	Basidiomycotina: micelio septado o levaduras Esporas asexuales como Ascomycotina.	*Teliomycetes*, sin basidiocarpo: royas y carbones *Hymenomycetes*: basidiocarpo, seta basidio descubierto *Gasteromycetes*: basidiocarpos que encierran basidios
	Deuteromycotina: micelio septado o levaduras, esporas asexuales como Ascomycotina No hay reproducción sexual o se desconoce	*Hyphomycetes* antiguos *Deuteromycetes*

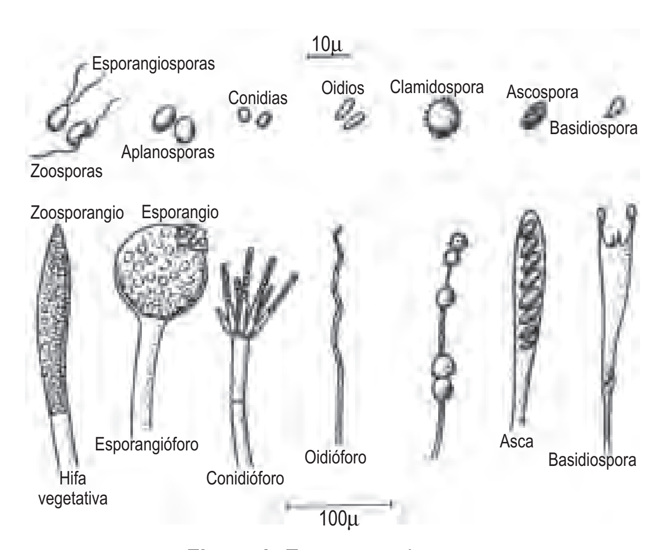


Figura 6- Esporas en hongos

Myxomycota

Subdivisiones: *Myxomycotina*: clases como *Myxomycetes*, sin pared celular, cuerpo ameboide (plasmodios de vida libre), masa multinuclear de protoplasma sin paredes definidas. Diploides, fructifican dando oosporas flageladas en la meiosis. Parecidos a los protozoos con nutrición holozoica.

Eumycota

Hongos verdaderos, con paredes de celulosa o quitina, estructura típicamente filamentosa, algunos unicelulares. Reproducción sexual o asexual, esporas sin flagelos. Se distinguen las clases:

a. ***Chytridiomycetes*****:** variedad de talos, células móviles con un solo flagelo posterior tipo látigo, acuáticos, parásitos.

b. ***Oomycetes*****:** hongos con micelio cenocítico bien desarrollado, cuyas células móviles poseen dos flagelos dirigidos en direcciones opuestas: uno de tipo látigo y el otro cepillo. Reproducción sexual: se forma una espora de resistencia (oospora) a partir de la oósfera fecundada, con pared celulósica. Parásitos y saprófitos acuáticos.

c. ***Zygomycetes*****:** hongos saprófitos o parásitos con micelio cenocítico o septado bien desarrollado. Reproducción sexual por fusión de gametangios generalmente iguales que forma una espora de resistencia (zigospora). No producen células móviles.

d. ***Trichomycetes****:* hongos con talo cenocítico filamentoso simple o ramificado adherido al tracto digestivo y cutícula externa de artrópodos vivos. Reproducción asexual por variedad de esporas. Reproducción sexual conocida como en los *Zygomicetes*.

e. ***Ascomycetes***: hongos que forman esporas dentro de estructuras especiales en forma de saco (asca) como resultado de la cariogamia y meiosis. Las ascas se presentan libres o en fructificación más generalmente en el tejido infectado.

f. ***Basidiomycetes*****:** hongos que forman esporas resultantes de cariogamia y meiosis sobre la superficie de estructuras especiales llamadas basidios.

g. ***Deuteromycetes*****:** grupo en el cual se coloca a los hongos que por su estructura general y reproducción asexual se parecen a los *Ascomycetes,* pero no se ha observado el estado sexual. También llamado *Fungi imperfecti*, incluyen a numerosas levaduras.

Función en el suelo

Los hongos son activos degradadores de sustratos carbonados y su rol esencial es la mineralización de fuentes complejas de carbono, atacando gran volumen de residuos con poco nitrógeno. Predominan así en suelos pobres, sobre restos vegetales frescos y sobre todo en plantas maduras donde la C/N puede ser muy alta.

Según los **sustratos** que emplean se distinguen los:

- **hongos glucofílicos**, sobre todo al estado de esporas con alto poder germinativo y rápido crecimiento. Son los primeros en atacar sustratos frescos; cuando las fracciones fácilmente atacadas se agotan, el hongo fructifica y permanece en estado de latencia (*Mucorales, Penicillum)*.
- **hongos que degradan la lignina**, las fracciones más resistentes, sobre todo *Basidiomycetes*
- **patógenos verdaderos**; sólo una fracción pequeña de los hongos que crecen o sobreviven en el suelo, como *Fusarium, Phytium, Ophiobulus, Rhizoctonia, Sclerotium, Verticillum.*

  Hongos patógenos del hombre pueden llegar al suelo, sobre todo en la zona tropical y la infección se generaliza fácilmente en la población. Una técnica común para detectarlos y aislarlos es colocar una hebra de cabello estéril en el suelo, el hongo lo coloniza, pues emplea la queratina.

- **predatores:** muchos hongos se nutren de protozoos, otros hongos, nemátodos. La hifa penetra en la presa, disminuyendo la movilidad, el hongo digiere el contenido celular y asimila las sustancias liberadas. Estos hongos participan en el equilibrio biológico del suelo, limitando el tamaño y actividad de ciertos grupos.

Los hongos participan en la **humificación**, degradando restos de animales y vegetales. Contribuyen a la **agregación del suelo**; la penetración de sus hifas permite compactar agregados, unir partículas.

Algunos forman **asociaciones simbióticas** con raíces de vegetales (**micorrizas**) que favorecen la nutrición vegetal.

Ecología

Los factores ecológicos más importantes son: nivel y naturaleza de la materia orgánica, pH, fertilizantes orgánicos y minerales, humedad, aereación, temperatura, profundidad, estación del año y cubierta vegetal.

El número de hongos filamentosos varía directamente con el contenido de materia orgánica. El agregado de restos vegetales estimula la población fúngica y altera la composición de la flora; ciertos géneros se hacen dominantes: *Penicillum, Trichoderma, Aspergillus, Fasarium, Mucor*. Algunas especies mantienen su número alto por períodos relativamente largos, en medios ácidos los hongos son la microflora dominante cuando se agrega materia orgánica y el nivel de nitrógeno es adecuado.

El **pH** es uno de los factores principales que gobiernan su actividad y composición. Muchas especies se desarrollan en amplio rango de pH, en medio de cultivo lo hacen desde pH 2-3 hasta 9,0 o superior. Dominan en ambientes ácidos por falta de competencia de bacterias. Algunas especies son más sensibles a la acidez que el resto de la comunidad y la acidificación del suelo puede ser un método de lucha, cuando se trata de hongos fitopatógenos. Otros hongos prefieren la neutralidad o bien ambientes alcalinos. El óptimo como grupo se sitúa en la vecindad de pH 6.

Humedad: si ésta es excesiva y la difusión del oxígeno está limitada, los hongos son los primeros perjudicados (método también empleado en la lucha contra fitopatógenos). Como se observa en el cuadro 4, en condiciones de sequedad, las especies que pueden esporular, lo hacen y la mayor proporción de estructuras fúngicas las constituyen las esporas. La humedad favorece la germinación de éstas y el desarrollo del micelio.

Aireación: algunas especies pueden desarrollarse a bajos niveles de O_2, pero en general un extremo de la hifa accede al aire. Son aerobios y su dependencia frente a este gas explica su mayor concentración en los primeros centímetros del suelo y su ausencia en niveles inferiores en suelos mal drenados, en barros y estuarios. Las esporas pueden soportar largos períodos de inundación; al drenar el suelo, los hongos retornan rápidamente a su posición de importancia.

Cuadro 4 - Cambios poblacionales de hongos en suelo de pastura a varios niveles de humedad hongos (10^3/g)

H%	total	hifas	esporas	esporas % del total
8,9	99	60	39	79
18,9	142	113	29	20
24,2	149	133	16	10
27,1	173	153	20	12

Temperatura: la mayoría son mesófilos, pero el desarrollo termófilo no es infrecuente. En el suelo los termófilos son escasos, pero son abundantes cuando la temperatura asciende por respiraciones (*compost*).

Profundidad: en suelos cultivados, los hongos son más abundantes en las capas superiores, pero pueden alcanzar gran densidad en los horizontes B de pasturas (más de 1 m), siguiendo la concentración de la materia orgánica: son cepas adaptadas a bajas concentraciones de O_2 o altas de CO_2. El efecto de la profundidad sobre la abundancia y composición de la flora fúngica está asociado con la concentración de materia orgánica y la composición de la atmósfera del suelo.

Estación del año: los meses cálidos de primavera son usualmente benéficos pero el excesivo calor y sequedad

del verano y los extremos de temperatura del invierno los afectan.

La materia orgánica fluctúa con la estación, es más abundante en otoño, el recuento tiende a ser alto en esta época y en primavera y declina en períodos secos del verano, aunque algunas localidades pueden tener ocasionalmente comunidades activas en verano. La acción de los hongos es baja en regiones con inviernos fríos.

La cubierta vegetal afecta cuali y cuantitativamente a la ficoflora, algunas especies están asociadas a ciertas comunidades vegetales, mientras que otras no parecen afectadas por ellas.

Levaduras

Si bien el término levadura no tiene significado taxonómico, es muy empleado para designar a aquellos hongos de estructura unicelular y que se reproducen por fisión binaria o gemación. Los géneros más encontrados en el suelo son: *Cándida, Hansenula, Lipomyces, Pichia, Pullularia, Rhodotorula, Saccharomyces, Sporobolomyces, Torula, Zygosaccharomyces.* (figura 7).

Ciertas cepas tolerantes a altos niveles de azúcares, capaces de realizar activas fermentaciones, se describieron en el suelo, pero no parecen ser habitantes normales, sino que llegan a él con frutos y restos vegetales. Generalmente se describen poblaciones de 10^3/g en áreas templadas, pero no es posible correlacionar su número con características climáticas o de suelo, y su rol en las transformaciones de la materia orgánica o mineral no está definido.

Muchas levaduras realizan fermentación alcohólica de azúcares y han sido empleados desde la antigüedad por el hombre. Pertenecen a las tres clases de hongos superiores: *Ascomycetes, Basidiomycetes y Deuteromycetes.*

Saccharomyces cerevisiae, principal agente de la fermentación alcohólica, es una levadura ascomicete. En cierto estado de su desarrollo la gemación cesa y la célula vegetativa se transforma en un asco, cada una con 4 ascosporas. La formación del zigote tiene lugar en un momento particular de su ciclo de vida, inmediatamente después de la germinación de las ascosporas haploides: pares de éstas se fusionan para formar células vegetativas diploides. El estado diploide se mantiene en todo período de desarrollo vegetativo y la meiosis ocurre inmediatamente antes de la formación de las ascosporas.

Otras levaduras ascomicetes forman zigotes por fusión entre células vegetativas inmediatamente antes de la formación de ascosporas, que al germinar dan lugar a la progenie vegetativa haploide.

Levaduras del género *Sporobolomyces* forman basidiosporas y en este caso toda la célula vegetativa se transforma en un basidio. La descarga de basidiosporas es un proceso violento, y las colonias se detectan rápidamente en cajas incubadas en posición invertida, la tapa de la caja se cubre con las esporas descargadas formando una imagen como el espejo de la colonia sobre el agar.

La mayoría de las levaduras del suelo se multiplican solamente por gemación: *Cándida, Cryptococcus, Rhodotorula, Torulopsis, Trichosporon*. Son poco numerosas en el suelo y para ponerlas en evidencia es necesario emplear técnicas de enriquecimiento en medios selectivos (10^3-10^4/g). Son abundantes en suelos con vid, llegan a ellos desde la superficie de frutos (especies activamente fermentadoras) y pueden subsistir poco tiempo en el suelo, excepto las ascosporas más resistentes.

Las levaduras típicas del suelo serían especies distintas a las epifitas, pero se conoce poco sobre sus fluctuaciones y su repartición; se sabe que son abundantes en suelos ricos en materia orgánica fresca o poco descompuesta, y también en los mantillos forestales. En suelos turbosos pueden representar hasta un 50% de la población total (entre 20 y 50 cm de profundidad). Se explica esta distribución por la aptitud a desarrollarse en anaerobiosis (cuando fermentan).

El efecto de la vegetación se manifiesta del punto de vista cuali y cuantitativo; ciertos especies estimulan preferencialmente a algunos géneros, la rizosfera es también un ambiente favorable a su multiplicación.



Figura 7- Células de levaduras gemando (seudomicelio)

Rol en el suelo

No es bien conocido: se los considera como organismos glucofílicos relacionados a la materia orgánica poco transformada, utilizan nitratos y azúcares simples u oligosacáridos, pero son incapaces de degradar glúcidos complejos, tal vez con excepción de las pectinas. Las levaduras del género *Lipomyces* parecen una excepción ya que pueden desarrollarse a débiles dosis de nitrógeno, con lo que pueden degradar mucho más carbono orgánico, y parecen favorecidas por ácidos húmicos. En la naturaleza se las encuentra frecuentemente asociadas a bacterias fijadoras de N_2 aerobias, sobre las que ejercen efecto estimulante.

Bibliografía

Dommergues, Y. y F. Mangenot, **Ecologie Microbienne du Sol,** 1970, Masson & Cie. París.

Frioni, L. **Procesos Microbianos,** 1999 Fundación de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.

Madigan, Martinko y Parker. **Brock, Biology of Microorganisms** 2000 Prentice Hall International.

Prescott-Harley-Klein, **Microbiología**, 1999 Mc Graw-Hill Interamericana.

www.fagro.edu.uy/microbiología/protistas superiores

Preguntas de repaso

1) Señale algunas importantes funciones que llevan a cabo las algas en los ecosistemas naturales.
2) Idem para los protozoos.
3) Idem para los hongos.
4) Relaciones de los hongos con la materia orgánica.
5) Aplicaciones biotecnológicas de los hongos.
6) Usos de las levaduras por el hombre.
7) ¿Cómo serían las relaciones evolutivas entre los protistas eucariotas?
8) ¿Cuál es el organelo considerado clave en la evolución?
9) ¿Cómo cultivaría algas a gran escala?
10) ¿Cómo lo haría con protozoos?
11) ¿Y con hongos?

Los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos

8 Ecología microbiana y métodos de estudio

Procesos microbianos en los ciclos biogeoquímicos

La **ecología microbiana** estudia las propiedades y el comportamiento de los microorganismos en su ambiente natural, sea el suelo, aguas, alimentos, animales (cuadro 1) y su estudio interesa a los investigadores por muchos aspectos de dominio público (cuadro 2).

Cuadro 1- Estudios en ecología microbiana

- amplio rango de organismos tanto macro como microorganismos
- tipos encontrados en distintas situaciones, asì como su número y diversidad
- las actividades realizadas por los organismos en el suelo y sus efectos en la fertilidad en el crecimiento vegetal
- las interrelaciones entre organismos, con las plantas y los animales y con el ambiente.

El término **ambiente** se refiere a todo lo que rodea a un organismo: los factores físicos, químicos y biológicos. Los microorganismos desempeñan roles más importantes de lo que podría inferirse por su pequeño tamaño. Desde una perspectiva ecológica los microorganismos son parte de las comunidades de los llamados **ecosistemas.** Cada organismo en un ecosistema interactúa con su entorno modificando marcadamente en algunos casos las características del ecosistema.

La **ecología microbiana** estudia las interrelaciones entre los microorganismos y el ambiente y determina las leyes generales que gobiernan estas interacciones. Se puede dividir en dos aspectos:

Cuadro 2- Temas de interés en ecología microbiana

Polución ambiental
- Detergentes biodegradables, contaminación de canales, cauces de agua, derrames de petróleo
- Polución por nitratos en aguas subterráneas, abonos orgánicos, zonas de agotamientos de O_2

Liberación de microorganismos alterados por ingeniería genética
- Daños por el congelamiento, biorremediación, fijación del nitrógeno
- Metano a partir de residuos
- Resistencia a los antibióticos
- Vida microbiana en ambientes inusuales
- Calentamiento global y sus consecuencias

Sinecología: que analiza las interacciones en un determinado lugar, considerando las especies, los factores bióticos y abióticos en ese lugar (suelo, mar, estanque).

Autoecología: en contraste con la anterior, comprende el estudio de una especie y el efecto que sobre ella en particular ejerce el ambiente (ejemplo: estudio de una cepa de *Rhizobium,* de patógenos vegetales, etc.)

Nociones de jerarquía ecológica

Ecosistema: es el sistema limitado en el espacio constituido por el conjunto de condiciones energéticas, físicas, químicas y biológicas que rodean a estos organismos

(ambiente). La energía penetra a los ecosistemas sobretodo en forma de **luz solar** y los organismos fototrófos la emplean para sintetizar nueva materia orgánica. Esta contiene todos los elementos (C, N, S, P, Fe, etc.) y cuando el organismo muere se libera la energía de sus constituyentes químicos que queda disponible para el ecosistema permitiendo el desarrollo de nuevos organismos. Estos realizan importantes procesos de síntesis y degradación, los autótrofos generan materia orgánica a partir de CO_2 y los otros son organótrofos y participan en la biodegradación y reciclado de la materia orgánica e inorgánica.

Se define para los elementos un **ciclo biogeoquímico**, en el cual el elemento experimenta cambios en su estado físico y de de oxido-reducción a medida que se mueve en el ecosistema.

El término **ecosistema** puede aplicarse a conjuntos de extensión variable:

- microecosistema, como un cultivo microbiano, agregado de un suelo
- macroecosistema complejo, por ejemplo, un océano
- mesoecosistema, como el estudio de un suelo, un estanque y su vegetación

Comunidad o biocenosis: está constituida por todos los organismos que habitan el ecosistema.

Población: está formada por las especies u organismos de tipo distinguible, por ejemplo la población de bacterias, de esporulados.

Individuo: componentes únicos de la población: células, hifa, cuerpo de reposo de hongo, espora microbiana.

Resumiendo, un **ecosistema** está integrado por:

- comunidad o biocenosis - poblaciones - individuos
- factores abióticos

Los microorganismos se encuentran en ambientes extremos, la diversidad es enorme y especies de bacterias, algas, hongos, protozoos, se aíslan en todos los tipos de suelos, en alimentos, aguas, restos orgánicos, animales. Sus funciones son variables, algunas se resumen en el cuadro 3.

La proporción relativa de las distintas especies está afectada en cierto grado por el ambiente: los hongos dominan en medios ácidos de bosques, las bacterias predominan en suelos inundados, los actinomicetes en ambientes secos, las algas son las primeras colonizadoras en suelos quemados, erosionados, cuando éste se humedece.

Cuadro 3- Actividades de los microorganismos del suelo

- reciclan nutrientes unidos inicialmente a la fracción orgánica del suelo
- cambian el estado de disponibilidad de elementos específicos para las plantas
- compiten con las plantas y entre ellos por los nutrientes esenciales para el crecimiento
- pueden realizar simbiosis con plantas, incrementan la capacidad de éstas para adquirir N o P
- son importantes agentes de biorremediación en ambientes contaminados
- pueden actuar como agentes de biocontrol de fitopatógenos

A pesar de su gran **ubicuidad** (los microorganismos son fácilmente transportados y dispersados, su tiempo de generación es generalmente corto y existen todos los tipos metabólicos), las comunidades de un ecosistema son características: el investigador, cuando busca un determinado microorganismo, no analiza todos los ecosistemas, sino que tiene idea aproximada sobre donde hallarlo. Esto se debe a que el ambiente regula la composición de la comunidad bajo la presión de los factores físicos, químicos y biológicos.

El ambiente interactúa con el microorganismo y se llega a un **equilibrio dinámico**, ya sea naturalmente, por cambio de estaciones, por ejemplo, o artificialmente, por prácticas agrícolas como arado, aplicación de pesticidas, abonos, etc.

El ambiente selecciona a las especies que se adaptan a las condiciones propias del ecosistema.

Del punto de vista ecológico, los habitantes de una comunidad se pueden agrupar en: **indígenas o autóctonos e**

invasores o alóctonos. Estos últimos, llamados **zimógenos** por Winogradsky (1924), crecen rápidamente cuando están disponibles sustratos ricos en energía (pajas, abonos), los autóctonos son los microorganismos que colonizan los materiales más recalcitrantes que quedan luego de un ataque primario.

Criterio de **autoctonía**: posibilidad de aislamiento repetido de la especie en distintas muestras de un mismo ecosistema, habilidad para usar los nutrientes comunes del medio y para soportar variaciones del ambiente, alta densidad del organismo, que será mayor en lugares con abundantes nutrientes y condiciones favorables como en el suelo en la vecindad de raíces (aspecto cuantitativo).

Otra aproximación de clasificación basada en características de crecimiento es la de la escuela japonesa que distingue:

- **oligotrofos**, que crecen mejor a bajas concentraciones de sustrato que en altas. Estos microorganismos se distinguen de los que crecen usualmente en medios de cultivo con altas concentraciones de nutrientes, que se llaman,
- **copiotrofos,** que en general coinciden con los zimógenos.

Una comunidad puede ser poli o monopoblacional. Por ejemplo polipoblacional, en el suelo, en una laguna, en el desierto, en cambio, una comunidad integrada por un patógeno vegetal es monopoblacional; estas cualidades reflejan el aspecto cualitativo de la comunidad.

Especie dominante: es la que exhibe una alta población o abundancia de filamentos. En general, la comunidad puede poseer dos o más especies codominantes.

Habitat : Es un área que posee cierto grado de uniformidad y cuyas características se supone que son de significado ecológico: superficie de una hoja, plantas o animales, el mar, una parcela de suelo fértil, porción de arena de desierto, etc. Su tamaño varía. Denota un conjunto de condiciones favorables o desfavorables para la vida, y es más específico que el término **ambiente**.

Las **superficies** son de importancia considerable como habitats microbianos, los nutrientes se pueden concentrar sobre ellas y estimular el desarrollo de numerosas especies. Se emplean portaobjetos solos o con algún aditivo nutritivo, enterradas en el suelo o sumergidas en aguas. Luego de algún tiempo se aprecia en el microscopio la formación de **microcolonias**, que se adhieren a la película, muy semejantes a las que se forman en superficies naturales (*biofilms*).

Nicho ecológico: Interesa conocer las **actividades** de los microorganismos. El que un organismo esté presente en un ecosistema no quiere decir que esté activo. Así, una transformación bioquímica específica es una buena prueba de que el grupo existe y está activo. Se aplica el término **nicho** a las funciones que el organismo realiza. El ambiente es como la dirección y el nicho la función del organismo.

Los microorganismos en la naturaleza

Los microorganismos se encuentran en todos ambientes naturales. En muchos de ellos, donde los organismos superiores están ausentes, debido a extremos físicos o químicos, gran variedad de microorganismos existen y se desarrollan como en los casos de acidez extrema, desecación, salinidad. Los factores del ambiente afectan a los microorganismos en la naturaleza tanto como lo hacen en el laboratorio. En ambientes naturales, en general, es el nivel y la naturaleza de los **nutrientes** disponibles, quien determinará los niveles de crecimiento bacteriano. Como estos niveles son en general mucho menores que en el laboratorio, la producción de células en la mayor parte de los ambientes naturales es menor que en los cultivos de laboratorio.

En la naturaleza los microorganismos sufren períodos de **abundancia** (restos de cultivos, animales muertos), seguido de períodos de **limitación,** en los cuales aprovechan de los polímeros intracelulares de reserva (ácido poli β-OH-butírico, polifosfatos, etc.). Son escasos los períodos de crecimiento exponencial.

Por ejemplo, el tiempo de generación de *Escherichia coli* en el intestino es de unas 12 horas (dos duplicaciones por día), mientras que en el laboratorio puede ser de sólo 20

minutos. Se estima que ciertas bacterias del suelo se desarrollan a menos del 1% de la tasa que muestran en medios de laboratorio, como reflejo de:

- bajo suministro de nutrientes
- la distribución de los mismos no es uniforme
- los microorganismos no crecen solos, salvo excepciones, en los ambientes naturales y sufren activa competencia de otros microorganismos

Sucesiones microbianas

Un principio fundamental del desarrollo de un ecosistema es la sucesión, o sea los cambios en las poblaciones que permiten el establecimiento de las llamadas comunidades *climax.* En lugar de competir por el mismo sustrato, algunos microorganismos cooperan para realizar una transformación particular, que no realizarían si actuaran solos. Se establece una progresión de cambios en las poblaciones microbianas a medida que el sustrato es metabolizado y las condiciones del ambiente (O_2, pH, potencial redox) cambian.

La figura 1 ubica a los organismos productores, consumidores y degradadores en el **ecosistema suelo-planta** y la figura 2 presenta un esquema de las interacciones entre los integrantes de la comunidad. Las del tipo 1 ocurren entre la comunidad microbiana y los componentes del suelo, las del tipo 2 entre los microorganismos entre si, las del tipo 3 entre las comunidades vegetales y microbianas y finalmente las interacciones del tipo 4, que involucran al suelo y la vegetación, interesan sólo accesoriamente al biólogo del suelo y son dominio de la fisiología y patología vegetal.

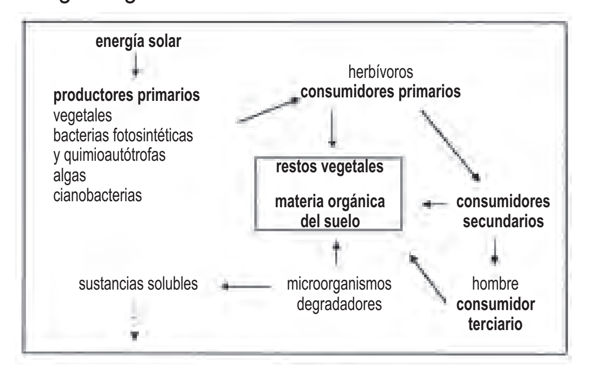


Figura 1- Organismos en el ecosistema suelo-planta

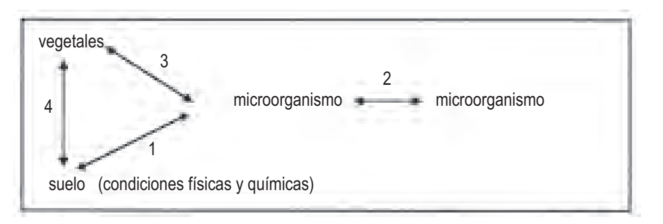


Figura 2- Interacciones en el ecosistema suelo-planta

Los ecólogos sostienen que un ecosistema estable tiene diversidad genética alta de modo de poder tolerar fluctuaciones del ambiente. Muchos estudios están dedicados a determinar si los cambios en la composición de las poblaciones microbianas y la cuantificación de la diversidad genética pueden ser empleados como indicadores sensibles del deterioro en propiedades de los suelos debido a prácticas de manejo, labranza, rotaciones, etc.

Ambientes microbianos

Acuáticos

Los entornos típicos son los océanos, estuarios, pantanos, lagos, ríos y manantiales. Difieren mucho entre sí en propiedades físicas y químicas y en las especies microbianas activas. Los organismos fotosintéticos predominantes son cianobacterias y algas en las zonas aeróbicas y bacterias fotosintéticas en las anaerobias. Las algas que flotan reciben el nombre de **fitoplancton** y las de los lechos son **algas bentónicas.** Son los **productores primarios** de estos ambientes. Los océanos abiertos son muy bajos en productividad primaria, mientras que las áreas en los océanos interiores son altas, siendo los lagos y manantiales los de mayor productividad, donde la concentración de nutrientes minerales requeridos por las algas es abundante y facilitan el desarrollo de peces y mariscos.

Las relaciones del oxígeno en un río son de interés, sobretodo cuando éstos reciben mucha materia orgánica como aguas servidas y desechos de la industria. Puede ocurrir un marcado déficit de O_2, como se ve en la figura 3 (Madigan *et al*., 2000), consecuencia del incremento en bacterias heterótrofas. Si hay mucho amonio, éste es oxidado a nitratos por las bacterias nitrificantes. El incremento en algas y cianobacterias es una respuesta primaria a los nutrientes inorgánicos, sobretodo el fosfato.

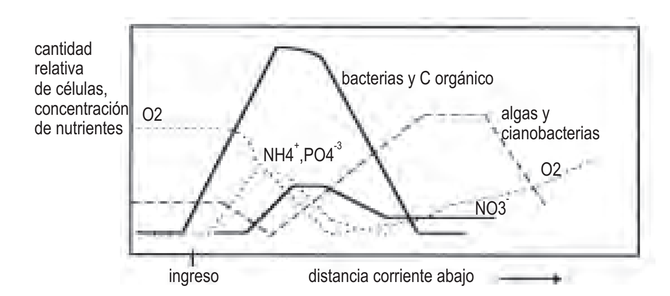


Figura 3 - Efecto de la llegada de aguas con materia orgánica a un río

A medida que el agua se aleja de la entrada del drenaje, la materia orgánica se consume gradualmente y el contenido de O_2 regresa a la normalidad. La disminución del oxígeno es indeseable ya que la mayoría de los organismos superiores requieren este gas y mueren en anaerobiosis. Se forman además compuestos de mal olor (aminas, amidas, mercaptanes, H_2S) por bacterias anaeróbicas, algunas de las cuales son también tóxicas para animales y plantas.

Terrestres

El comportamiento de una población microbiana y sus efectos sobre el **suelo** están gobernados en gran parte por las características físicas y químicas de éste. El concepto suelo se puede abordar desde distintos puntos de vista:

- **edafológico**, el suelo es la capa más externa de la superficie de la tierra, diferente a la roca madre de la cual tomó origen, por la acción combinada de factores muy diversos como el clima, roca madre, vegetación, microflora, en el transcurso del tiempo pedológico

- **agrícola**, el suelo es la región de la tierra que permite la vida de las plantas, del cual obtienen el soporte mecánico y los nutrientes necesarios

- **microbiológico**, el suelo constituye un medio único, ya que contiene gran población de bacterias, actinomicetes, algas, hongos, protozoos, virus, es uno de los lugares en donde las interacciones biológicas son más intensas y donde ocurren los procesos bioquímicos vinculados a la degradación de la materia orgánica, las transformaciones de los elementos minerales muy importantes para la nutrición de las plantas, como el N, P, S, Fe, Mn, etc.

- **general,** el suelo se describe como un organismo vivo, ya que nace por la pedogénesis de la roca madre, se desarrolla por múltiples procesos de degradación y síntesis, almacena reservas y puede llegar a morir por mineralización gradual si no se conserva su reserva de materia orgánica: **el humus**.

Las actividades de los microorganismos en este ambiente altamente heterogéneo, difieren drásticamente del comportamiento manifestado en medios clásicos de laboratorio. Los microorganismos no actúan solos; otros microorganismos, la micro y meso fauna, la vegetación y las propiedades físicas y químicas del suelo y la acción del clima y el hombre, contribuirán a exaltar o a inhibir un determinado proceso biológico.

Descripción general del suelo

El suelo está compuesto de cinco componentes principales: la fracción mineral, la orgánica, agua, aire y organismos vivos. El esquema siguiente resume las proporciones de cada uno, aunque los valores varían con los suelos y con la profundidad. De la fracción inanimada, la cantidad de materia orgánica y mineral es relativamente constante en un sitio dado, mientras que el aire y agua fluctúan (representan aproximadamente la mitad del volumen del suelo y constituyen el espacio poroso) (figura 4).

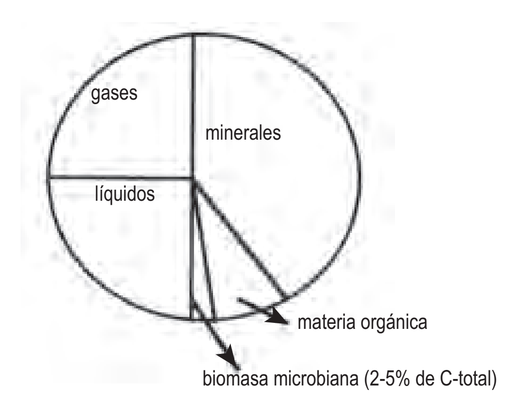


Figura 4- Principales componentes del suelo

La fracción mineral

Esta fracción, generalmente menos que el 50% del volumen del suelo, se originó por desintegración de la roca madre, meteorizada en el curso del tiempo. Ejerce gran importancia en la disponibilidad de nutrientes, la aireación, la retención y el movimiento del agua y afecta a la microflora. Las partículas varían desde gravas de más de 2 mm hasta las arcillas, menores a 2 micras, visibles sólo al microscopio. Forman agregados con la materia orgánica que contribuyen a la estructuración del suelo. Químicamente están constituidos por aluminosilicatos, óxidos y carbonatos. Las arcillas presentan la mayor reactividad ya que poseen una gran relación superficie/ volumen.

La fracción mineral presenta propiedades químicas y actividades variables según el tamaño de las partículas. La arena y el limo están formados por cuarzo, feldespatos, micas, y otros silicatos. Su actividad química es casi nula a corto plazo. La arcilla está constituida por silicatos de estructura folìacea semejante a las micas y se caracterizan por presentar propiedades coloidales, con gran relación superficie a volumen con predominio de cargas electrostáticas negativas. Están formadas por minerales secundarios del grupo de la montmorillonita, illita, caolinita, etcétera.

Las arcillas y el complejo arcilla-humus retienen iones de signo contrario, generalmente cationes. Estos están en equilibrio con la solución del suelo, con los que se pueden intercambiar. Cuando aumenta la concentración de un catión en la solución, por ejemplo al agregar un fertilizante, el catión agregado desplaza una parte de los otros cationes retenidos por el coloide, que a su turno pasan a la solución.
La cantidad total de cationes que puede retener un suelo constituye su capacidad de intercambio **(CIC)**, que se expresa en miliequivalentes/100 g de suelo. Los cationes se pueden ordenar por su capacidad de adsorción:

$$Al^{+3} > H^{+} > Ca^{+2} > Mg^{+2} > K^{+} = NH_4^{+} > Na^{+}$$

Muchas sustancias asimiladas por |os microorganismos son aniónicas, como los bicarbonatos, nitratos, fosfatos, sulfatos, molibdatos, pero la capacidad de intercambio aniónico no es apreciable. El amonio es fácilmente retenido por los coloides del suelo, pero los nitratos, formados por la oxidación biológica de aquellos son, por el contrario, muy móviles, desplazándose tanto lateralmente como en profundidad.

La fracción orgánica

Materiales orgánicos de origen animal o vegetal llegan o son formados en el suelo, donde son descompuestos por las actividades microbianas. La materia orgánica que no es completamente degradada contribuye a la formación del **humus**, material amorfo, formado por una mezcla compleja de sustancias altamente polimerizadas. Dentro de esta fracción, una pequeña proporción es soluble en agua (azúcares, aminoácidos), pero la mayor parte consiste en materiales oscuros, insolubles.

El humus constituye la **reserva nutritiva** de un suelo, por sus propiedades coloidales retiene e intercambia cationes básicos, se asocia a minerales coloidales y puede ser adsorbido en la superficie de partículas minerales.

Componentes líquidos y gaseosos

El agua del suelo está sujeta a fluctuaciones que afectan profundamente a las poblaciones microbianas y a las raíces. Contiene solutos como sustancias minerales y orgánicas además de gases y constituye el medio nutritivo líquido para los microorganismos.

Si el suelo está saturado con agua, el exceso drenará por gravedad. La cantidad de agua retenida luego de un escurrimiento de 2-3 días se denomina **capacidad de retención de agua o capacidad de campo** y según la textura, esta tensión puede variar entre 0,1 y 0,5 barias para suelos de textura gruesa o fina, respectivamente. En general, se toma como promedio una succión de **0,33 barias**. Cuando el suelo se seca, los espacios porosos se llenan progresivamente con aire, hasta que toda el agua capilar es removida, quedando el agua más fuertemente retenida: **osmótica e higroscópica**.

A medida que el suelo se seca, resulta más dificultoso remover el agua residual. Es posible medir, por variedad de métodos, la presión de succión necesaria para llevar el suelo a un determinado nivel de humedad. Esta presión es normalmente medida en **cm de succión de agua**,

o más convenientemente como su log_{10}, conocida como escala de pF, cuyos valores varían entre 0 y 7.

Algunos niveles de importancia biológica:

- 400 barias (aproximadamente 400 atmósferas, pF 5,6), tensión sobre la cual cesa toda actividad microbiológica en el suelo
- 15 barias (aproximadamente 15 atm; pF 4,2), tensión en la cual la mayoría de los vegetales alcanza el punto de marchitamiento permanente
- 1/3 de baria (aproximadamente 1/3 atm; pF 2,5), humedad correspondiente a la humedad equivalente en suelos de textura media a gruesa, es decir la humedad de una muestra de suelo que luego de haber sido saturado, se somete por 30 minutos a una fuerza centrífuga de 1000 g (aproximadamente 2.440 rpm).

La **aireación y la humedad** están directamente relacionados ya que la porción del espacio poroso que no contiene agua está ocupada por gases, que constituyen la atmósfera del suelo. Comúnmente, la concentración de CO_2 excede a la atmosférica en un factor de 10 o 100 y el O_2 es menos abundante.

Estas variaciones están relacionadas con la actividad respiratoria de la población del suelo: vegetal y microbiana.

- Un suelo bien aireado, desde el punto de vista microbiológico, es aquel en el cual los procesos que requieren O_2 proceden a rápida velocidad.
- Un suelo mal aireado está asociado a un mal drenaje y saturación como ocurre en general en suelos pesados, con muchas arcillas que poseen gran proporción de microporos que retienen fuertemente el agua. El oxígeno es poco soluble en agua y nuevos procesos ocurren, muchos de ellos perjudiciales para los vegetales, por ejemplo, se libera N_2 o CH_4, aparecen inhibidores orgánicos y se acumulan $S^=$, Fe^{++}, Mn^{++}.

Vemos así que las características del suelo determinan:

- el ambiente donde se encuentran los microorganismos
- la composición de la población microscópica tanto cuali como cuantitativamente. Toman del suelo el agua, gases, nutrientes minerales y orgánicos, y el suelo les sirve como tampón en los cambios bruscos que pueden ocurrir en el pH. Los microorganismos contribuyen, con otros organismos, a la alteración de la roca madre, formando la reserva orgánica (humus), pero participan también a su degradación.

- el desarrollo microbiano más extensivo ocurre como microcolonias en la superficie de las partículas del suelo, como se aprecia en la figura 5 (Madigan *et al.*,2000).

Como resumen, el cuadro 4 resume los factores que inciden en la actividad biológica.

Cuadro 4- Factores que afectan la actividad microbiana

- características de los propios microorganismos
- disponibilidad de nutrientes: materia orgánica, O_2, N, S, P, etc.
- factores físicos: temperatura, aireación humedad, pH
- manejo: aireación/compactación; distribución de la MO disponibilidad de agua; temperaturas en primavera
- residuos vegetales o aplicación de abonos
- sistemas de cultivo y rotaciones
- interacciones con otros microorganismos
- interacciones con otros organismos (plantas, animales)

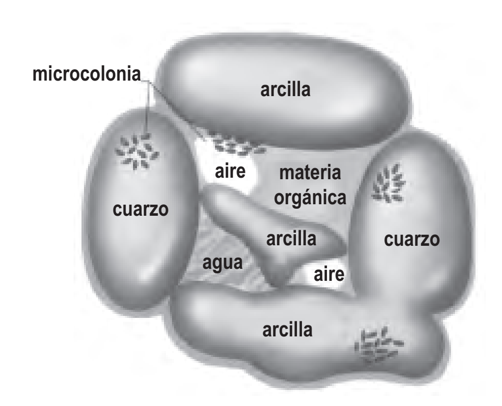


Figura 5- Agregado de suelo

Métodos de estudio en ecología microbiana

Los métodos que se aplican a estudios de ecología microbiana se resumen en el cuadro 5:

Cuadro 5- Técnicas de estudio en ecología microbiana

Forma y ordenamiento de los microorganismos *in-situ*
Lámina enterrada, microscopía óptica, fluorescente, anticuerpos fluorescentes, sondas marcadas
Aislamiento y recuentos
Recuentos de viables:
microflora total, algas, hongos, etc.
grupos fisiológicos: celulolíticos, fijadores de N_2, amilolíticos, nitrificantes
Biomasa microbiana C, N, P, de la biomasa (kg/ha)
i) Recuentos y peso de cada microorganismo
ii) Método de fumigación-incubación: diferencias en flujo de $C\text{-}CO_2$ entre muestras fumigadas y no fumigadas con cloroformo y reinoculadas con suelo fresco
iii) Método de fumigación-extracción: el C, N, P, de la biomasa muerta se extrae y se cuantifica
Actividad biológica global
Respiración: aerobia (CO_2, O_2), anaerobia (N_2, CH_4, etc)
Enzimas: deshidrogenasas, fosfatasas, ureasas, hidrolasas
Actividad metabólica: evaluación de productos finales (CO_2, amonio, nitrato) o iniciales (sustratos)
Medida de la bidiversidad: Estudios de los microorganismos sin aislamiento previo
Extracción de ADN y su reasociación
Secuenciación del ARN ribosomal (16S y 23S)
Composición de lípidos
Perfiles metabólicos: utilización de hidratos de C, se evalúa diversidad fisiológica o funcional

Es necesario distinguir actividades: **i) potenciales**, que se evalúan en el laboratorio (*in-vitro)* y tienen un valor relativo de comparación de situaciones (suelos, ecología, manejo) ya que reflejan lo que el ecosistema podría rendir si las condiciones fueran las óptimas (temperatura, aireación, nutrientes). La presencia de una alta población de un determinado grupo fisiológico no significa que el proceso se esté realizando. Una población abundante puede resultar inactiva, si no se reúnen las condiciones necesarias. Se determinan en el laboratorio, **ii) reales**, que se evalúan en el terreno (*in situ)*, donde interactúan todos los factores abióticos. Resultan más difíciles de determinar: la respiración en el terreno requiere la instalación de campanas para recoger el CO_2. La evaluación de la nitrificación en suelos luego del agregado de fertilizantes nitrogenados en el campo, requiere medidas de la evolución de N-(NH_4^+, NO_2^-, NO_3^-) por distintas técnicas: desplazamiento y destilación, por empleo de electrodos específicos, colorimetría, etc. que se realizan en el laboratorio, pero los procesos ocurrieron en el campo.

Los procesos que involucran pérdidas de elementos se evalúan por la liberación de gases, en dispositivos cerrados y análisis en cromatografía gaseosa (N_2, N_2O, CH_4, H_2, CO_2)

El empleo de **elementos marcados:** C_{14}, N_{15}, S_{32} etc. resulta muy útil en estudios ecológicos.

Estos estudios brindan información sobre los tipos microbianos, biomasa (material vivo) y la función y se realizan tanto en comunidades en su ambiente natural (**sinecología**) como sobre especies aisladas en condiciones de laboratorio (**autoecología**). Pero, para lograr una comprensión completa de los microorganismos, se combinan ambas aproximaciones.

El hombre no estudia estos temas por simple curiosidad, sino por su vinculación con la fertilidad del suelo, depuración de aguas, deterioro de alimentos, biorremediación de ambientes. Estos conocimientos se emplean luego para dirigir estos procesos en forma beneficiosa.

Determinación de la forma y ordenamiento de los microorganismos *in situ*

El estudio de los microorganismos *in-situ* tiene la ventaja de permitir al ecólogo microbiano medir los efectos de cambios físicos y químicos en una muestra aislada. Sin embargo, los estudios efectuados en aislamientos de es-

pecies activas, contribuyen a completar la información sobre su número y actividades. Se emplean procedimientos microscópicos para la observación *in-situ*, incluso se filman eventos en el tiempo.

El suelo no debe alterarse y la estructura se mantiene por impregnación con gelatina o resinas. Cortes finos permiten la observación al microscopio luminoso o en el electrónico por transmisión o por barrido de superficies.

La **microscopía fluorescente** permite visualizar las relaciones de bacterias y hongos con partículas orgánicas e inorgánicas. Es posible efectuar aislamientos con micromanipulador; las bacterias ofrecen más dificultad por su pequeño tamaño y mayor espaciamiento. La rizósfera ofrece un hábitat muy favorable para su proliferación y se han desarrollado técnicas muy precisas que muestran la relación de células de la raíz con microorganismos de interés (*Rhizobium, Azotobacter*, etc.) empleando anticuerpos fluorescentes específicos.

La **microscopía óptica**: la clásica técnica de Rossi y Cholodny, entierra un portaobjeto solo o con un film de nutrientes, permite observar cambios de la distribución espacial de los microorganismos en el tiempo. Son empleados otros materiales transparentes como celulosa, cutina, quitina.

Aislamiento y recuento de los microorganismos en medios selectivos

Rara vez un ambiente natural contendrá un sólo tipo de microorganismo, en la mayor parte de los casos existe una gran variedad. Los microorganismos se aíslan de la naturaleza en **cultivos puros** para su identificación y el estudio de su autoecología. Los medios empleados son muy numerosos: generales, selectivos, diferenciales, etc. Estos procedimientos permiten el aislamiento o bien el recuento de viables (medios líquidos o sólidos). El cuadro 5 presenta algunos ejemplos en el aislamiento de bacterias.

El éxito del enriquecimiento requiere el uso de una fuente apropiada de **"inóculo".** Si bien los microorganismos son muy ubicuistas y se encuentran en casi todos los ambientes, el investigador busca aquellos ambientes en donde el organismo deseado predomina. La pasteurización del inóculo (80ºC, 15 minutos) al matar células vegetativas permite aislar muchos organismos **esporulados** en distintos medios de enriquecimiento.

Winogradsky (microbiólogo soviético, 1856-1953) fue el primero en evaluar la actividad de un grupo de especies en el **suelo mismo**, en lugar de hacerlo con una especie aislada, en medio artificial. El suelo se humedece convenientemente hasta formar una pasta (técnica de la tierra empastada) con el agregado de alguna sustancia nutriente para el grupo microbiano que se desea exaltar.

El suelo se incuba en cajas de Petri hasta el desarrollo de colonias en su superficie. Esta técnica se sigue empleando actualmente, por ejemplo, para poner en evidencia rápidamente la carencia del suelo en ciertos nutrientes como fósforo o calcio. *Azotobacter,* muy exigente en fósforo, crece solo alrededor de las fuentes de este elemento, colocadas sobre el suelo empastado.

La **columna de Winogradsky** se emplea aun para el enriquecimiento de bacterias fotosintéticas purpúreas y verdes (capitulo 3). Este modelo se ha empleado mucho para enriquecer variedad de procariotas, tanto aerobios como anaerobios: la columna se enriquece con un sustrato particular cuya degradación se desea estudiar y se deja un tiempo para que estos microorganismos se seleccionen. Al enriquecimiento en la columna sigue el **aislamiento en cultivo puro sobre agar,** pudiéndose obtener especies de crecimiento lento, quizá ecológicamente más importantes. Todo aislamiento termina en **medio sólido**, dando **colonias** originadas por la progenie a partir de una sola célula.

Recuentos

Las densidades microbianas se evalúan por diferentes métodos de recuento:

de viables en medios líquidos o sólidos o en plantas en caso de simbiosis. No existe un medio de cultivo que permita el desarrollo de la población microbiana heterótrofa.

Se usa medio con extracto de suelo y una fuente de carbono y energía (glucosa). Más frecuentemente se determinan las poblaciones de bacterias de acuerdo a los grupos fisiológicos de interés para el investigador, para los cuales es posible formular medios y condiciones de cultivo selectivos. (Anexo práctico).

de totales o microscópicos, evalúan poblaciones viables y no viables de bacterias en suelos: en general 10^8-10^9 células/g de suelo seco. Los recuentos de viables no representan un 10% de estas cifras, y muchas veces menos del 1%.

Las bacterias del suelo raramente se encuentran aisladas, sino que se agrupan en colonias (figura 5) y muchas veces resulta difícil separarlas al efectuar las suspensiones-diluciones, para los recuentos de viables. Otra limitación es la adsorción sobre partículas de humus o arcillas, que disminuye los recuentos de bacterias.

Actividad biológica global

Sin detenernos en el estudio de grupos particulares de organismos de un ecosistema dado, muchas veces interesa conocer globalmente su actividad mediante el empleo de técnicas que evalúan la actividad de la micropoblación en su conjunto. Son técnicas comparativas empleadas para informar rápidamente sobre la potenciabilidad biológica de estos ambientes.

Actividad respiratoria

En el caso del suelo se correlaciona esta actividad con el contenido de materia orgánica, humedad y prácticas de manejo. Pero se incluye el CO_2 de la mesofauna y de las raíces, resultando difícil distinguir la contribución de cada uno en ensayos de campo. La actividad *in situ* se determina evaluando volúmenes conocidos de la atmósfera sobre una superficie determinada de terreno (m^2).

La determinación del **CO_2** se realiza por varias técnicas:

- absorción en solución alcalina (KOH) y determinación volumétrica o gravimétrica
- conductividad eléctrica en solución alcalina
- espectrometría en la zona del infrarrojo
- cromatografía gaseosa, con detector de conductividad térmica.

La absorción del **O_2** se mide por electrodos específicos o en modificaciones del aparato de Warburg, con recipientes internos que permiten muestras de suelos de 10-20 g, los cambios de presión se miden a volumen constante, el CO_2 se recoge en solución alcalina.

Actividad enzimática

Las actividades de los microorganismos requieren la participación de un conjunto de enzimas. La actividad de una de ellas, bien escogida, puede reflejar la actividad biológica global. El cuadro 6 muestra algunas de las enzimas evaluadas en los suelos.

Agregando un antiséptico, como el tolueno, se logra en parte detener la proliferación microbiana durante el período de incubación y pueden evaluarse las enzimas liberadas por los microorganismos, los vegetales y animales. Son actividades potenciales, evaluadas en el laboratorio, bajo condiciones controladas.

Ciertas enzimas son ubicuistas, se encuentran virtualmente en todos los tipos de suelos, como la ureasa, catalasa, fosfatasas y los varios tipos de peptidasas. Otras pueden producirse en el suelo bajo ciertas condiciones.

Entre las **hidrolasas** se evalúan la sacarasa, amilasa, celulasa, incorporando a muestras de suelo solución con el sustrato específico. Luego de una incubación apropiada en condiciones controladas, se extraen los productos de la hidrólisis, determinándose los azúcares reductores, durante el tiempo de incubación. Es muy empleado el acetato de fluoresceína como sustrato de numerosas hidrolasas, evaluándose la fluoresceína liberada.

Otras enzimas evaluadas son: fosfatasas, con glicerofosfato como sustrato, proteasas, ureasas, ARNasa, ADNasa. En la evaluación de enzimas que catalizan reacciones redox, se trabaja en ausencia de antiséptico, pues las enzimas son endocelulares, como las deshidrogenasas.

La determinación de la **actividad deshidrogenásica** de los suelos es muy empleada por distintos grupos de trabajo, eliminando completamente el oxígeno y reemplazándolo por un aceptor artificial de electrones, como el **tricloro fenil tetrazolio (TTC)** o el **iodo nitrofenil tetrazolio (INT)**, que se reducen a **tricloro fenil formazán (TPF) o iodo nitroformazán (INP), rojos,** que se extraen con acetona o metanol y se evalúan a 485 nm frente a curva patrón (figura 6).

Es necesario trabajar al abrigo de la luz, pues estos aceptores de electrones son fotosensibles.

Se encontraron correlaciones significativas entre consumo de oxígeno y el número de bacterias con la actividad deshidrogenasa, que se relaciona con el nivel de materia orgánica descomponible y con la biomasa microbiana del suelo. La evolución de las deshidrogenasas y el CO_2 fueron las determinaciones que permitieron evaluar más rápidamente respuestas de la microflora del suelo frente a diferentes manejos del suelo.

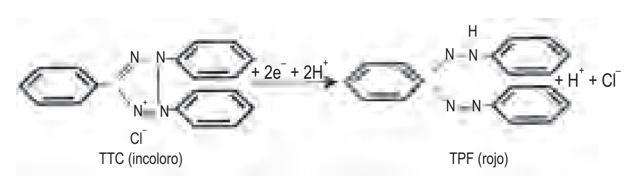


Figura 6 - Actividad deshidrogenasa con triclorofeniltetrazolio (TTC) como aceptor artificial de electrones

Un grupo importante de **hidrolasas** son evaluadas con el **diacetato de fluoresceína**. Sólo luego de la hidólisis biológica se libera la fluoresceína, que se evalúa en el espectrofotómetro, frente a curva patrón.

Es de hacer notar que las enzimas en suelos y aguas no se determinan directamente, por análisis de sus moléculas, sino indirectamente por su capacidad de transformar una cantidad dada de un sustrato orgánico en productos conocidos en un tiempo dado, bajo condiciones controladas, de temperatura, pH, concentración iónica. Se miden, por lo tanto, actividades potenciales.

Los métodos de análisis pueden encontrarse en: Schinner *et al.*, 1999, Tabatabai, 1994, Burns, 1978, Anexo práctico.

Cuadro 6- Algunas enzimas en el suelo

Sistema enzimático	Reacción que cataliza
α y β amilasa	Hidrólisis de enlaces glucosídicos α y β 1-4
arilsulfatasas	$R\text{-}SO_3^{=} + H_2O \longrightarrow R\text{-}OH + H^+ + SO_4^{=}$
asparaginasa	asparagina + $H_2O \longrightarrow$ aspartato + NH_3
catalasa	$2\,H_2O_2 \longrightarrow 2\,H_2O + O_2$
celulasa	Hidrólisis de enlaces glucosídicos β1-4
quitinasa	Hidolisis de enlaces β1-4 aminoglucanos
deaminasa	Enlace amida + $H_2O \longrightarrow$ ácido carboxílico + NH_3
deshidrogenasas	$X\text{-}2e^-$ + aceptor de electrones (colorante) $\longrightarrow$ X + aceptor-$2e^-$
fenoloxidasas	Difenol + 0,5 $O_2 \longrightarrow$ quinona + H_2O
fitasas	Hexafosfato de inositol + 6 $H_2O \longrightarrow$ inositol + 6 PO_4^{-3}
α y β galactosidasa	Galactósido + $H_2O \longrightarrow$ ROH + galactosa
α y β glucosidasa	Glucósido + $H_2O \longrightarrow$ ROH + glucosa
Hidrolasas, en general	Diacetato de fluoresceína (DAF) $\longrightarrow$ fluoresceína
lipasa	Triglicérido + 3 $H_2O \longrightarrow$ glicerol + 3 ácidos grasos
ligninasa	Liberación de radicales libres de anillos de la lignina
nitrogenasa	$N_2 \longrightarrow NH_3 \longrightarrow$ aminoácidos, ureídos
nucleotidasas	Desfosforilación de nucleótidos
peptidasas	Péptidos $\longrightarrow$ aminoácidos
pirofosfatasa	Pirofosfato + $H_2O \longrightarrow$ 2 PO_4^{-3}
proteasas	Proteinas $\longrightarrow$ péptidos y aminoácidos
ureasa	Urea $\longrightarrow 2\,NH_3 + CO_2$

Las enzimas del suelo no se recuperan fácilmente, y pocas veces son aisladas en forma pura. Ellas están inmobilizadas con arcillas y el humus.

La actividad enzimática fluctúa, como las poblaciones microbianas con condiciones bióticas y abióticas. Las actividades son particularmente altas en suelos productivos ricos en materia orgánica. Muchos factores como la humedad, temperatura, aireación, cambios estacionales, prácticas de manejo, la forestación, etc. ejercen influencias en la presencia y abundancia de enzimas.

Actividad bioquímica global

Se compara la capacidad de degradación de un sustrato particular midiendo su desaparición por pérdida de peso o análisis químico o indirectamente siguiendo la producción de metabolitos, o por respirometría. La muestra (suelo, agua, restos orgánicos, alimentos) se incuba con la sustancia cuya biodegradación se desea evaluar: proteína, ácidos, húmicos, almidón, en condiciones controladas de laboratorio (**actividad potencial)** o en el campo (**actividad real**) y se sigue la desaparición de la sustancia o la aparición de productos del metabolismo: amonio, nitratos, sulfatos.

Estas técnicas evalúan la actividad de un grupo grande de microorganismos (**grupos fisiológicos**) sin detenerse en la caracterización de géneros o especies responsables.

El empleo de **modelos computabilizados** constituye una invalorable ayuda para el ecólogo y su empleo facilita las interpretaciones.

El empleo de **radioisótopos, microelectrodos e isótopos estables** ha contribuido mucho en la evaluación de la actividad microbiana en ambientes naturales.

Así, en evaluación de la fotosíntesis se mide la captación del CO_2-C^{14} en las células y con S^{35} los procesos de oxido-reducción del azufre. La metanogénesis en ambientes naturales se puede evaluar por la conversión del CO_2 marcado a metano marcado en presencia de H_2. El N^{15} es otra de las herramientas más empleadas en la evaluación de transformaciones del N en ambientes naturales.

En el estudio de **microambientes**, se emplean **microelectrodos** (de O_2, $S^=$, pH, amonio) para evaluar procesos biológicos en la naturaleza.

La técnica de **percolación** (Dommergues, Mangenot, 1970), se emplea en evaluación de la cinética de algunos procesos de mineralización o de oxidorreducción. Se simula el perfil del suelo colocándolo en una columna de vidrio. El metabolito en estudio se recicla a través del suelo (cíclica o acíclicamente) y la población se investiga como una unidad biológica. Se emplea para el estudio de la hidrólisis de numerosas sustancias, la oxidación del amonio, de sulfuros, etc. Periódicamente se extraen muestras del líquido percolante y se analizan los metabolitos, en función del tiempo.

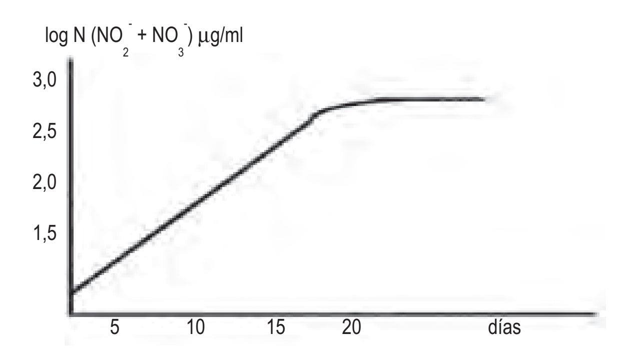


Figura 7- Actividad bioquímica en suelos: percolación cíclica de una sal de amonio

La figura 7 indica que la reacción de oxidación del amonio es una actividad bacteriana ya que los hongos o actinomicetes no exhiben incrementos logarítmicos en la actividad bioquímica. La velocidad de reacción se puede medir mejor por la acumulación de nitrito y nitrato, que por la desaparición del amonio, que puede ser adsorbido a los coloides.

Evaluación de la biomasa microbiana

La fracción de la materia orgánica que se encuentra en células microbianas se emplea mucho como parámetro de actividad biológica ya que son los microorganismos los agentes que catalizan los procesos biológicos.

La biomasa microbiana se determina por:

- **recuento del número de células** o midiendo la longitud de micelio presente en una muestra, calculando el volumen y peso de tales propágulos al multiplicarlo por el peso específico, se puede calcular el peso de los microhabitantes de una muestra de suelo, agua, alimentos
- **técnica de fumigación e inoculación (FI) (**Jenkinson y Powlson, 1976**)** al desinfectar el suelo con cloroformo la mayoría de los microorganismos muere y sus restos son mineralizados al reinocularlo con suelo fresco. Se miden los picos de CO_2 de ambas muestras luego de un período de incubación (Anexo práctico).

Una pequeña fracción de la materia orgánica es rápidamente convertida en CO_2 (2,3-3,4% del carbono del suelo) y representa la biomasa. Este constituye uno de los métodos más interesantes propuestos en los últimos años para evaluar la fracción viva de la microflora del suelo y refleja variaciones debidas a prácticas de manejo, uso de pesticidas, etc.

- **técnica de fumigación-extracción (FE**): que consiste en extraer el carbono, el nitrógeno o el fósforo, lábiles de la microflora, que se valoran por técnicas clásicas (oxidación con dicromato de potasio en caliente y valoración espectrofotométrica) (Schinner *et al.,* 1996).

La técnica de fumigación presume:

1- Que todos los microorganismos son muertos durante el proceso y el C de los organismos muertos es más fácilmente mineralizado que la de los vivos. La degradación del humus nativo ocurre al mismo ritmo en suelos fumigados y en no fumigados.
2- El solo efecto de la fumigación es matar a los microorganismos y la muerte de los mismos en las muestras no fumigadas es despreciable.
3- La fracción del C de la biomasa muerta mineralizada en un período dado de tiempo es similar para todos los suelos en estudio.

Esta última presunción no es enteramente válida, en suelos que reciben grandes cantidades de sustratos frescos, o aquellos muy arcillosos que adsorben materiales liberados por las células lisadas.

C-biomasa: F- NF/k

Donde: F-NF es la diferencia en los flujos de C-CO_2 entre la muestra fumigada (F) y la no fumigada (NF) y k es la fracción del C de la biomasa mineralizado a CO_2 en el curso del período de incubación (usualmente entre 10 y 14 días).

Estos valores obtenidos a partir de cultivos puros de bacterias y hongos enriquecidos con C^{14} varían entre 43 y 50% (0,43 a 0,50) y la mayoría de los autores emplean el valor 0,45. En suelos minerales se suele emplear 0,33. El desconocimiento de esta constante es una de las limitaciones del método.

Idea de biomasa de los diferentes grupos microbianos

Una forma útil de expresar la densidad de los distintos grupos microbianos en el suelo, es señalando su **biomasa en kg materia viva/ha**.

Ejemplo, por recuentos: 1g de suelo fértil puede contener 5m de micelio fúngico, $1x10^8$ células bacterianas, $1x10^6$ esporas de actinomicetes. Si consideramos el peso de una bacteria o actinomicete como $1,5x10^{-12}$g y que 1m de micelio fúngico puede alcanzar $9,4x10^{-5}$g, la biomasa total de esta microflora llegaría a $6,0x 10^{-4}$g, la que representa menos del 0,06% del peso total del suelo (1 g). Este dato puede ser en realidad menor, ya que el peso promedio celular se determinó en ensayos de laboratorio, en condiciones nutricionales más favorables que las de campo.

Un suelo arenoso, con área superficial de partículas baja (72 cm^2/g), tendría sólo el 0,02% de la superficie de sus partículas colonizadas por bacterias. Se comparan las imágenes al microscopio electrónico de partículas de suelo colonizadas con la observación de la vegetación desde un avión, en un desierto. En el ejemplo anterior vimos que 1g de suelo fértil puede contener 10^9 bacterias/g; si el volumen de cada una de ellas es de 1 $micra^3$ y su densidad media de 1,5 g/cm^3, tenemos que su peso será:

$$P = V x d = 10^{-12} cm^3 x 1,5g/cm^3 = 1,5 x 10^{-12}g$$

Biomasa de bacterias/g suelo = $1,5 x 10^{-12} x 10^9 = 1,5 x 10^{-3}$g/g

Este dato que representa 0,15% del peso del suelo, puede llevarse a kg/ha: una hectárea de suelo de 0,20 m de profundidad pesa:

10.000 m^2 x 0,2 m = 2.000 m^3 (d aprox. = 1g/cm^3), que equivale a un peso de 2.000.000 kg de suelo. La biomasa bacteriana será de:

2,0 x 10^6kg x 1,5 x 10^{-3} kg = 3.000 kg/ha

El cuadro 7 presenta resultados de evaluaciones promedio del número y la biomasa de diferentes grupos de microorganismos del suelo. Nótese la importancia de la biomasa fúngica, hecho no reflejado por el recuento de propágalos/g de suelo.

Cuadro 7- Número aproximado y biomasa (kg/ha de suelo) de organismos en el suelo

Grupo	Número/g suelo	Biomasa microbiana kg/ha
bacterias	3-500 millones	300-10.000
actinomicetes	1-20 "	300-3.000
hongos	5.000-100.000	500-5.000
levaduras	1.000-100.000	100-5.000
algas	1.000-100.000	10-1.500
protozoos	1.000-100.000	5-200
virus (bacteriófagos)	10^{10}-10^{11}	
nemátodos	10-100	1-100
lombrices		10-1000

Indicadores de la calidad del suelo

Los cambios en la calidad del suelo son avaluados por indicadores y éstos deben ser comparados con los valores deseables (niveles umbral o límites críticos) a diferentes intervalos de tiempo, en el agroecosistema seleccionado. El problema que se presenta, como se comprenderá, es determinar cuales son los valores que se consideran deseables, los de un suelo saludable. En general el umbral de comparación se obtiene de los ecosistemas no perturbados, por ejemplo las actividades de un suelo bajo bosque se comparan con las del mismo suelo no alterado (campo natural) (Sicardi *et al.*, 2004).

En áreas donde ya no existen ecosistemas naturales, el establecimiento de los umbrales de equilibrio o deseables de un indicador, se efectúa a partir de los valores medios resultantes de estudios realizados con anterioridad, en los mismos suelos. La determinación de estos límites de comparación constituye una limitante en muchos estudios.

El cuadro 8 señala las determinaciones más corrientes en la evaluación de la actividad biológica de suelos y aguas, que incluyen análisis físicos, químicos y biológicos, a los cuales se van agregando aquellos que analizan presencia de microorganismos sin aislarlos (biodiversidad).

La selección de parámetros como indicadores biológicos de la calidad del suelo, sensibles a cambios en el uso y manejo del mismo y que se correlacionen con las clásicas determinaciones físicas y químicas, es motivo de numerosos estudios (Pankhurst *et al,* 1997; Smith *et al*, 2000, van Bruggen y Semenov, 2000, Frioni *et al*, 2003, Albanesi *et al,* 2003).

Cuadro 8- Parámetros empleados como indicadores de la calidad del suelo

Indicadores físicos	Indicadores químicos	Indicadores biológicos
textura	C-orgánico total	recuentos, biomasa microbiana
capacidad de campo	pH	enzimas, respiración
profundidad	conductividad eléctrica	medida de la biodiversidad: perfil de ácidos nucleicos, de ácidos grasos, perfiles metabólicos
densidad	N, P, K, extraíbles	N-mineralizable

El cuadro 9 es una típica aplicación de estos parámetros en la evaluación del efecto de distintos sistemas de labranzas en los suelos. Se aprecia una mayor acumulación de materia orgánica, N% y grupos microbianos con prácticas que como las conservacionistas no exponen al humus a la rápida biodegradación.

Cuadro 9- Relación entre propiedades físicas, químicas y microbiológicas en suelos con labranza mínima y convencional (LM/LC) (promedio de 6 localidades en dos profundidades)

Parámetros	LM/LC a (0-7,5cm)	LM/LC a (7,5-15cm)
C-orgánico total	1,41	0,99
N-total	1,29	1,01
densidad	1,04	1,05
espacio poroso con agua	1,28	1,11
aerobios totales	1,35	0,66
bacterias	1,41	0,68
hongos	1,35	0,55
anaerobios facultativos	1,31	0,96
anaerobios totales	1,27	1,05

Medida de la biodiversidad

Se ha recurrido a métodos genéticos y bioquímicos que no requieren el aislamiento y cultivo previo de los microorganismos activos en un ecosistema.

Históricamente una variedad de métodos bioquímicos, serológicos y fenotípicos se han empleado para caracterizar bacterias, tales como rhizobios y otras asociadas a las plantas: perfil de proteínas totales, de plásmidos, análisis de ácidos grasos, resistencia intrínseca a antibióticos, sensibilidad a bacteriófagos e isoenzimas.

Más recientemente el desarrollo y la aplicación de métodos moleculares, basados en estudios de ácidos nucleicos, han permitido grandes avances en la identificación y determinación de relaciones filogenéticas de organismos de importancia para la agricultura y el medio ambiente.

Los métodos más recientes pueden agruparse en dos categorías (Bottomley, 1998):

- los basados en la caracterización de los **ácidos nucleicos,** que permiten agrupar cepas en grupos coherentes, pudiendo establecerse relaciones filogenéticas y diferenciar cepas de igual género y especie
- los basados en la detección **fenotípica de marcadores genéticos,** como resistencia a antibióticos, enzimas metabólicas, proteínas fluorescentes, perfil de ácidos grasos, etc.

Ecología genética

En los últimos años ha habido una eclosión de metodologías genéticas para analizar las comunidades microbianas a nivel de laboratorio y en ecosistemas naturales. Son relativamente simples aunque el equipamiento y los reactivos, pueden limitar su empleo masivo. Detectan pequeñas cantidades de material genético y también permiten clasificar microorganismos en grupos filogenéticos.

La doble hélice del ADN es la base de dos análisis muy importantes:

- sondas genéticas, construidas para reconocer secuencias específicas de un microorganismo
- la reacción en cadena de la polimerasa, conocida por su abreviatura en inglés *(PCR)*

Estas técnicas pueden también emplearse a secuencias de ARN: ribosomal (rARN), mensajero (mARN) y de transferencia (tARN). Dos tipos, el rARN y el mARN se usan mucho en análisis genéticos, estudios filogenéticos y en estimaciones de actividad metabólica. La secuencia de bases del ARN se transcribe a secuencias conservadas del ADN.

Numerosos trabajos señalan la utilidad y las limitaciones de estos métodos basados en caracteres genotípicos, sobre todo en estudios de microorganismos asociados a plantas. El aislamiento del ácido nucleico no siempre es requerido para la aplicación de métodos de detección molecular, que involucran tratamientos enzimáticos o amplificación de trozos de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR).* Para este estudio puede utilizarse una colonia bacteriana entera, un trozo de planta colonizada por un hongo micorrítico, o un nódulo entero en el caso de rhizobios (Schneider y De Bruijn, 1996).

Algunas de las técnicas utilizadas para caracterizar ácidos nucleicos incluyen: extracción del ADN de una muestra de suelo y determinación del rango de reasociación de ese ADN. Se ha determinado que unas 4.000 tipos de

bacterias genéticamente diferentes existen en una muestra de suelo (Torsvik *et al*, 1990).

Sondas génicas

Su construcción resulta una técnica muy especializada que excede este texto. La metodología específica se puede consultar en manuales como el de Sambrook *et al* (1990). Para su construcción, la secuencia del gen de interés debe ser conocida y ser particular a una especie microbiana: esta secuencia resultará muy útil en la detección de ese organismo. Otras pueden codificar enzimas involucradas en la fijación del N_2 y su uso puede indicar cuando un suelo contiene bacterias con esos genes. Actualmente, muchas secuencias se encuentran descriptas en la web, permitiendo al investigador obtener la que desea para sus estudios. La construcción de la sonda implica copiar la hebra complementaria. Su tamaño puede variar de 30 a 40 pb hasta varios cientos de pares de bases. Algunas de ellas se marcan con un radiactivo (P^{32} en el P-azúcar del ADN) o no radiactivos, como resistencia a antibiótico.

La detección de un grupo particular de bacterias se hace en una membrana sobre la cual se lisaron las células aisladas antes de que se desnaturalicen ambas hélices. Lo mismo ocurre con la sonda, que luego de un tiempo en contacto se reúnen con la secuencia de bases complementaria de la bacteria en estudio, homología evidenciada por radiofotografías (P^{32}).

Southern blots/hibridación

Esta técnica permite identificar la localización de una secuencia de interés, por ejemplo, dentro de un plásmido. Para ello, todos los plásmidos de la célula bacteriana son extraídos y separados en un gel de agarosa en electroforesis. Luego se transfieren a un membrana y se hibridizan con la sonda específica. Sólo aquellos plásmidos con la secuencia homóloga a la sonda serán revelados por el marcador usado.

Reacción en cadena de la polimerasa (*PCR, Polymerase chain reaction)*

Constituye una poderosa tecnología que ha revolucionado las técnicas en biología molecular, de gran aplicación en: diagnóstico clínico, microbiología ambiental, inmunología y muchos otros campos de investigación.

La enzima aislada de *Thermus aquaticus* (**Taq polimerasa**), permite amplificar eficientemente el ADN a 72ºC y no se desnaturaliza a altas temperaturas. Esta enzima puede alargar *in vitro* un pequeño oligonucleótido (*primer*), adicionando nucleótidos en su secuencia si éste está hibridizado a una hebra de ADN complementario llamado molde (*template)*, siguiendo las reglas de complementariedad de Watson y Crick. Para esto es necesario un exceso de nucleótidos en la solución que sirven de unidades de montaje de la hélice a complementar en el molde. El proceso de polimerización del ADN en el *PCR* comprende, por lo tanto, 3 pasos:

- El ADN contenido en la secuencia a ser amplificada es desnaturalizado por el calor, generalmente a 95ºC
- Los oligonucleótidos (*primers*) se adhieren a secuencias complementarias del ADN molde. Este paso se realiza a una temperatura menor, que varia según el *primer* utilizado
- La Taq polimerasa polimeriza el segmento flanqueado por dos *primers* contiguos, siguiendo el orden dado por la hebra complementaria, en el sentido 5'-3'

El ciclo se repite muchas veces hasta llegar al nivel deseado de amplificación, la que ocurre exponencialmente. Un ADN de doble cadena producirá dos hélices dobles luego de un ciclo, cuatro luego de 2 ciclos, 8 luego de 3, 1024 luego de 10 ciclos y así sucesivamente. De esta forma se pueden conseguir muchas copias de una zona específica de ADN. El producto de la amplificación se somete a separación electroforética en gel de agarosa, y es coloreado con bromuro de etidio, que al intercalarse entre las bases del ADN puede ser fácilmente visualizado al ser expuesto a luz ultra-violeta.

En el caso de bacterias, pueden utilizarse *primers* que reconocen secuencias repetidas en el genoma *(rep-PCR*). Con esto se obtiene una serie de bandas de amplificación de distinto tamaño que son características de cada cepa en particular. La distribución de las mismas se analiza en programas de computación que emplean el principio de la taxonomía numérica, agrupando individuos según relaciones de homología, que aparecen en dendogramas (figura 8, Schneider y De Bruijn, 1996).

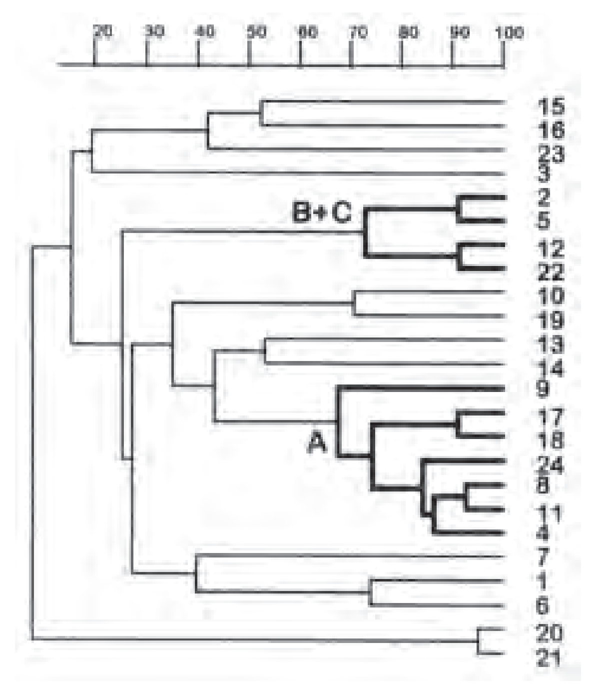


Figura 8- Análisis de fragmentos de restricción en *Rhizobium loti* y *Bradyrhizobium* que nodulan *Lotus* (dendograma con las cepas ordenadas de 1 a 24)

Polimorfismo de fragmentos de restricción (*RFLP)*

El método emplea enzimas de restricción que rompen el ADN en determinados lugares produciendo lo que se llaman "**fragmentos de restricción**". Estos numerosos fragmentos pueden ser separados por su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa y ser comparados entre distintos microorganismos. Posteriormente pueden ser transferidos a una membrana de nylon por la técnica de *"Southern"* y uno o más fragmentos pueden ser detectados por hibridización con una sonda específica. Este fragmento puede ser de tamaño diferente en los individuos de una población, caracterizando un polimorfismo. Las sondas son diseñadas para detectar determinados fragmentos polimórficos, asociados a ciertos genes. Algunas secuencias polimórficas se repiten innumerables veces una luego de la otra a lo largo del ADN y el número de repeticiones varía de cromosoma a cromosoma.

Existen sondas específicas para estos *loci* que en análisis por ***RFLP*** proporcionan bandas de ADN en forma de código de barras (*DNA fingerprinting*) (Hungría, Araújo, 1994).

Perfil de plásmidos

A pesar de que la mayoría de la información genética de una bacteria puede estar contenida en el cromosoma, algunas bacterias contienen material genético denominado plásmidos, que se pueden extraer. Por electroforesis en gel de agarosa y coloración con bromuro de etidio, los plásmidos se evidencian por una o más bandas en el gel. Esta técnica se conoce como perfil plasmídico (figura 9) que se puede complementar con la hibridización con sondas específicas. Dado que el número y el tamaño de los plásmidos pueden ser característicos de un microorganismo, su empleo brinda información útil sobre la identidad de los mismos.

Las secuencias de ácidos nucleicos no sólo detectan organismos específicos, sino que también evidencian actividades. Los genes reporteros, que indican la actividad de un gen de interés asociado, están típicamente insertados en un **operón** que contiene el gen que codifica la actividad de interés. Esta fusión de genes se logra a veces empleando un **transposón**, que inserta al azar el gen reportero en el genoma bacteriano. El proceso produce mutantes con diferentes fusiones de genes. La expresión de los genes reporteros da una señal fácil de detectar, como la producción de β-galactosidasa (gen lac z), fácil de detectar colorimétricamente en medio sólido.

Un gran número de marcadores genéticos se han descrito, entre ellos genes de resistencia a antibióticos, como el *nptII* que codifica resistencia a kanamicina, que fue el primer gen usado como marcador. Este método presenta el riesgo de expandir resistencias a otros organismos en la naturaleza.

La sonda construida a partir de un plásmido de la cepa Kim-5, confirma la presencia de la cepa Kim-5 en los carriles 1,3, y 4.Las restantes no contienen el ADN Kim-5 (figura 9) (Pepper y Josephson, 1998) .

Detección fenotípica de marcadores genéticos

Genes que codifican enzimas se usaron como marcadores no selectivos, como el *xylE* que codifica catecol 2,3 oxigenasa, el *lacZY* (codifica β-galactosidasa y lactosa permeasa) y el *gusA* (β-gluconidasa GUS) muy usado en estudios de rhizobios en nódulos donde no existe pro-

ducción endógena de GUS. Puede utilizarse la hibridización de ADN para detectar estos marcadores fenotípicos.

1 2 3 4 5 6

Figura 9- Perfil de plásmidos de rhizobios aislados de nódulos (arriba) y las hibridizaciones correspondientes (abajo).

El uso de marcadores que codifican para la proteína **luciferasa** se ha extendido mucho ya que la formación de luz es fácilmente detectable. El gen *lux* emite luz vía la actividad luciferasa sobre el sustrato luciferina: la actividad puede medirse en medio de cultivo sólido o líquido (*Rhizobium meliloti* por siembra de contenidos nodulares, autoradiografía y visualización directa de colonias luminiscentes), o aún en muestras de suelo o aguas.

El avance en la puesta a punto de todas estas técnicas moleculares ha facilitado el seguimiento de un microorganismo en ambientes altamente colonizados, como la rizosfera, restos orgánicos en degradación y seguramente conducirá a importantes avances en los estudios de interacciones entre microorganismos y entre microorganismos con plantas, animales y el hombre.

Numerosas técnicas se emplean para evaluar la actividad biológica en ambientes naturales, algunas son aplicaciones de determinaciones clásicas de la microbiología y otras incursionan en técnicas moleculares y taxoquímicas que permiten el análisis de las comunidades de ecosistemas sin el cultivo previo de los microorganismos activos. Estas técnicas se correlacionan en general con parámetros físicos, químicos y biológicos empleados.

La información sobre secuencias del ADN y del ARN de numerosos organismos (bacterias, hongos y se extiende a los virus) crece muy rápidamente, con el empleo de técnicas basadas en empleo de sondas y tecnologías que aplican *PCR*.

Se determinan también actividades enzimáticas asociadas a organismos particulares. Estas técnicas permiten también detectar organismos que no han podido ser aislados y cultivados en el laboratorio. Los procedimientos en el suelo mismo traen aparejado problemas de contaminación con sustancias que interfieren en los análisis.

En resumen: algunas aplicaciones de análisis molecular en microbiología del suelo (Pepper y Josephson, 1998):

- **Detección específica de bacterias en el suelo**: por *PCR* se pueden detectar bacterias específicas con gran sensibilidad en ADN extraído directamente del suelo o el mismo extraído de células aisladas. El uso de sondas facilita el análisis, que confirma la identificación por métodos convencionales.

- **Detección específica de poblaciones microbianas:** muchos procesos microbianos son analizados en ecosistemas naturales mediante el uso de sondas específicas para algunos grupos: nitrificantes, coliformes, degradadores de herbicidas, etc. (figura 10).

- **Detección de virus en el suelo**: son analizados por la técnica de *PCR* secuencias de virus, luego de su extracción, lisis y purificación por filtración en geles. Los virus ARN deben ser primero transcriptos a ADN con la enzima transcriptasa reversa.

- **Secuencias del ADN:** las secuencias únicas de los microorganismos son analizadas por varios procedimientos que amplifica estas secuencias: *REP-PCR y ERIC-PCR,* analizan secuencias conservadas, repetitivas en puntos diferentes de una bacteria en particular.

- **Detección de genes que codifican actividades microbianas:** empleo de genes reporteros, extracción de ARNm, permiten estimar rangos específicos de biodegradación de xenobióticos, genes lux pueden detectar *E. coli*,

con gran precisión, mientras que se requieren 10^2-10^3 células/g suelo para su detección por otras técnicas.

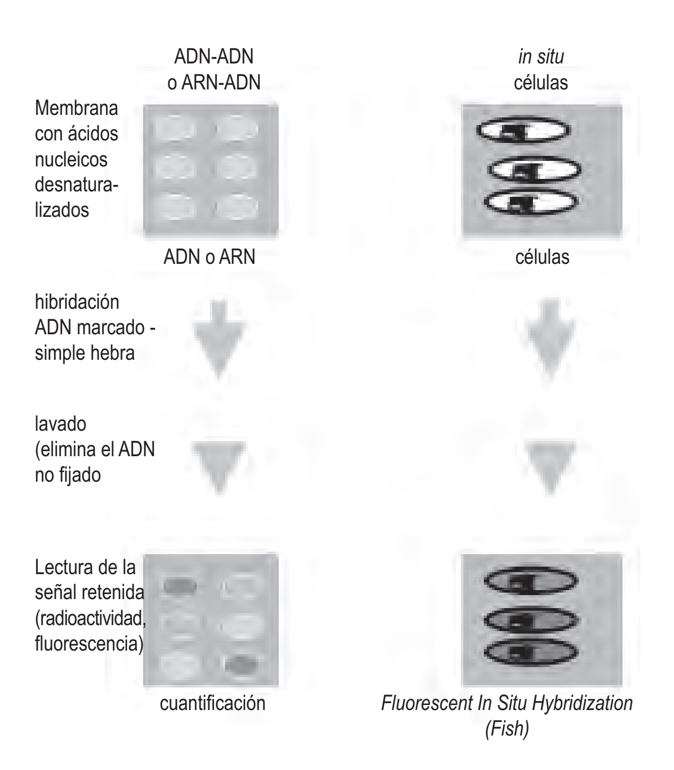


Figura 10- Determinación de la estructura de una comunidad bacteriana basada en el análisis de los ácidos nucleícos

Ciclos biogeoquímicos de los elementos

Los microorganismos participan en las transformaciones de los elementos en la naturaleza. Si bien cuando un sustrato complejo llega a un ambiente particular, aguas, suelos, aire, comienza a degradarse en su globalidad, es frecuente realizar el estudio en base a los **ciclos biogeoquímicos de los distintos elementos**. Así, realizaremos esta abstracción mental para estudiar las transformaciones que sufren los compuestos carbonados, nitrogenados, azufrados, fosforados, con hierro, etc., en combinaciones orgánicas e inorgánicas, en ecosistemas naturales, en particular en el ecosistema suelo-planta-hombre.

Un ciclo biológico abarca todas las posibles vías que un elemento puede seguir en la naturaleza (figura 11) aunque no obligatoriamente todas las etapas deben cumplirse en un ecosistema dado. Así, la nitrificación de sales amoniacales puede detenerse por falta de oxígeno, el pH puede limitar la entrada del N_2 a la tierra por fijación biológica, la solubilización de fosfatos puede inhibirse por escasa actividad biológica.

Los microorganismos actúan sobre la materia orgánica y mineral con el propósito de obtener:

- **energía**
- **subunidades para sus macromoléculas**

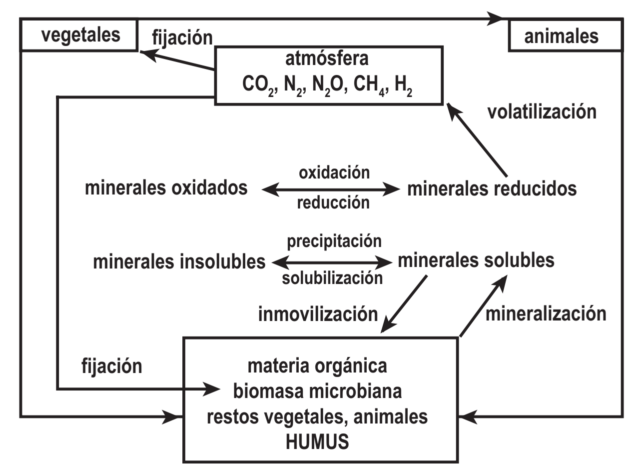
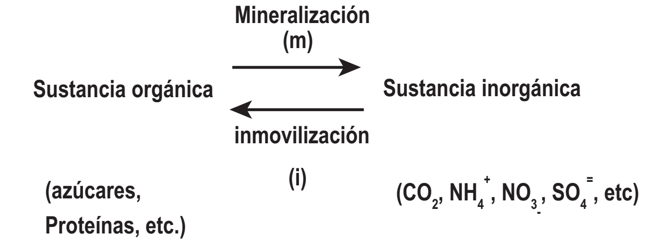


Figura 11- Esquema general de un ciclo biogeoquímico

Procesos microbianos

En las transformaciones microbianas de la materia orgánica y mineral encontramos una serie de procesos simultáneos y opuestos que podemos resumir en los siguientes 4 pares de procesos.

- **Mineralización inmovilización**



La mineralización, pasaje de formas orgánicas a minerales, es un proceso muy general y ocurre prácticamente en todas las condiciones ecológicas. En efecto, no hay sustancia orgánica de origen biológico que no sea degradado por algún grupo de microorganismos en ambientes naturales. Existen sustancias naturales de mineralización muy lenta, llamadas **recalcitrantes,** caso de la lignina, algunos biocidas naturales, el humus. Numerosas sustancias orgánicas producto de las actividades del hombre llegan a los ecosistemas naturales y son muy difícilmente degradadas, caso de los pesticidas. Estas sustancias que producen serias poluciones, se denominan **xonobióticas** (capítulo 22).

Se habla de **inmovilización** cuando las sustancias inorgánicas son **asimiladas** por los microorganismos para integrarlos a su biomasa (proteínas, fosfolípidos, etc.). Se produce una competencia con las plantas y animales, quienes pueden sufrir carencias temporales. La biomasa microbiana a su turno será biodegradada y los nutrientes vuelven a formas inorgánicas.

● Oxidación-reducción

reducción (r)

Sustrato ⇄ **Sustrato reducido**

oxidación (o)

($SO_4^{=}$, NO_3^-, CO_2, ác. org.) ⇄ ($S^=$, NH_4^+, CH_4, H_2O azúcares)

Numerosos procesos de este tipo involucran a elementos importantes para ecosistemas naturales (C,N,S,P,Fe) como la nitrificación, sulfooxidación, desnitrificación, sulfatorreducción, metanogénesis, oxidación y reducción de compuestos con hierro, carbonados, etc. Las plantas dependen de muchos de estos procesos para obtener los nutrientes asimilables a partir de la reserva orgánica del suelo (**humus**), si no existen aportes exógenos. Estos cambios en el estado de oxido-reducción de ciertos elementos, que pueden realizarse tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, son procesos muchas veces generadores de energía para el microorganismo y en algunos casos pueden convertir a los elementos en formas no disponibles para los cultivos e incluso conducirlos a gases, que se pierden en la atmósfera.

Ejemplos:

materia orgánica + NO_3^- ⟶ CO_2, H_2O, N_2 (N_2O)
gases a la atmósfera

● Fijación-volatilización

Fijación (f)

Sustancia gaseosa ⇄ Sustancia no gaseosa

Volatilización (v)

La **fijación** es la conversión de sustancias volátiles en no volátiles y los ejemplos más típicos son:

- **fijación biológica del C (fotosíntesis o quimiosíntesis)**
- **fijación biológica del nitrógeno (FBN)**, muchas veces realizados en la misma célula (cianobacteria y bacterias fotosintética fijadoras de N_2):

Fotosíntesis bacteriana: CO_2 + SH_2 → $(CH_2O)n$ + S^o + H_2O
gas no gaseoso

FBN N_2 (gas) $\xrightarrow[\text{nitrogenasa}]{8e^-,\ 8H^+}$ 2 NH_3 + H_2

NH_3 + esqueletos carbonados ⟶ aa ⟶ proteínas (no gaseosos)

La **volatilización** es un proceso físico que puede llevar a la atmósfera productos formados por vía biológica. Un ejemplo es el caso del amonio producido por amonificación, que en suelos alcalinos, de baja capacidad de intercambio catiónico, puede perderse a la atmósfera. Otros ejemplos son las pérdidas de nitrógeno como N_2, N_2O, por desnitrificación. Compuestos azufrados se pueden perder también como H_2S, mercaptanes, etc.

● Solubilización-precipitación

La solubilización es un proceso muy importante ya que permite hacer disponible a muchos elementos insolubles, como

el caso del fósforo. Por el contrario, la precipitación elimina de la solución del suelo nutrientes de las plantas, como el caso del hierro. Son también procesos físico-químicos pero involucran pasos previos de acción microbiológica.

Solubilización (s)

Sustancias insolubles ⇄ Sustancias solubles

Precipitación (p)

Estas reacciones se observan en el caso de compuestos con P, Fe, etc.

H^+ (ácidos de origen biológico)
P insoluble ⟶ P soluble $(PO_4H)Ca$ y $(PO_4H_2)_2Ca$
$(PO_4)_2Ca_3$
hidroxiapatita, etc.
polvo de huesos, etc.

$Fe^{++} + O_2$ ⟶ $Fe(OH)_3$ (hidróxido férrico, puede obstruir cañerías)
soluble
disponible → insoluble

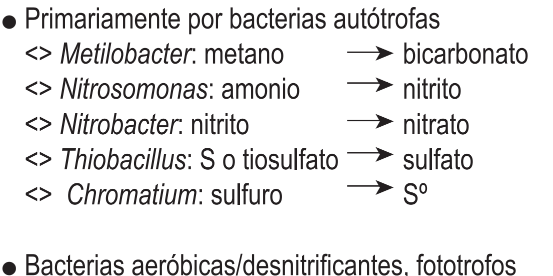
La metodología empleada en el estudio de estos procesos se resume en el cuadro 5 y lo detalles de las técnicas se encuentran en el Anexo práctico.

El cuadro 10 resume las formas orgánicas bajo la cual se presentan sustancias con C, N, S. Los cuadros 11 y 12 muestran procesos de oxidación y de reducción involucrados en transformaciones de estos tres principales elementos.

Cuadro 10- Formas orgánicas del C, N y S en el suelo

Carbono	
~ 20% polisacáridos	~ 75% humus
~ 5% amino azúcares, amino ácidos	
Nitrógeno	
~ 40% humus	~ 35% amino ácidos
~ 7% amino azúcares	~ 18% N aromático
Azufre	
~ 45% S-amino ácidos (cistina, metionina)	
$SO_4^=$ orgánicos adenosina, proteínas-S-Fe (N_2asa),	

Cuadro 11- Procesos de oxidación en los ciclos del C, N y S


- Primariamente por bacterias autótrofas
  - <> *Metilobacter*: metano ⟶ bicarbonato
  - <> *Nitrosomonas*: amonio ⟶ nitrito
  - <> *Nitrobacter*: nitrito ⟶ nitrato
  - <> *Thiobacillus*: S o tiosulfato ⟶ sulfato
  - <> *Chromatium*: sulfuro ⟶ S^o
- Bacterias aeróbicas/desnitrificantes, fototrofos
- Algunas pueden cometabolizar sustratos sin obtener energía (*Beggiatoa*)

Cuadro 12- Procesos reductivos en los ciclos del C, N, S

Ocurren tanto en condiciones aerobias como anaerobias
Procesos asimilativos: los productos son usados por la célula: heterótrofos
- reducción de los NO_3^- ⟶ amonio ⟶ N-aa
- reducción del CO_2 ⟶ compuestos orgánicos
- reducción de los sulfatos ⟶ H_2S ⟶ S-aa

Procesos desasimilativos
Ocurren en condiciones anaerobias, compuestos de C, N y S actúan como aceptores de e- en respiraciones:
- desnitrificación: NO_3^- ⟶ N_2 gas *Pseudomonas*
- metanogénesis: CO_2 ⟶ CH_4 " *Methanobacterium*
- sulfato reducción: $SO_4^=$ ⟶ H_2S " *Desulfovibrio, Desulfotomaculum*

Bibliografía

Albanesi, A. Calidad de suelo: propiedades biológicas y evolución en ecosistemas semiáridos. En: **Microbiología Agrícola: Un aporte de la investigación argentina.** 2003 Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina: 7-22

Bottomley, P. J. Microbial Ecology, En: **Principles and Applications of Soil Microbiology**, 1998. Sylvia, Fuhrmann, Hartel y Zuberer Prenctice Hall, N. Jersey: 149-185.

Burns, R.G. Enzyme Activity in Soil: Some Theoretical and

Practical Considerations. En: R. G. Burns, Ed. **Soil Enzymes**, 1978, Academic Press, N. York:295-340.

Dommergues, Y. y F. Mangenot, **Ecologie Microbiènne du Sol**, 1970, Masson et Cie, París.

Frioni, L., Sicardi, M., Pereyra, C. Indicadores biológicos de la calidad del suelo sensibles a prácticas de manejo. En: **Microbiología Agrícola: Un aporte de la investigación argentina**, 2003, Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina: 23-37.

Frioni, L. **Procesos microbianos.** 1999 Fundación de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.

Hungria, M. y R. S. Araujo Caracterizaçao das estirpes por técnicas moleculares: o uso del métodos de PCR a RAPD, en: **Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**, 1994, EMBRAPA, Brasilia, DF, pp:183-199.

Jenkinson, D. S. y D. S. Powlson, The effect of biocidal treatments on metabolism in soil, Method for measuring soil biomass, 1976, Soil Biol. Biochem., 8: 209-213.

Pankhurst, C.E., Doube, B. M., Gupta, V.V.S.R. **Biological Indicators of soil health**. 1997, CAB International, USA, UK.

Pepper, I. L. y Josephson, K. L. Molecular Genetic Análisis in Soil Ecology. En: **Principles and Applications of Soil Microbiology,** 1998, Sylvia, D. M. ; Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G. and Zuberer, D. A. Prentice Hall, London.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. Maniatis, T. **Molecular cloning. A Laboratory Manual.** 1989, Cold Spring Harbor Press, New York.

Schinner, F.; Öhlinger, R. Kandeler, E., Margesin, R. **Methods in Soil Biology**, 1996, Springer-Verlag, Berlín: 426pp.

Schneider, M. y F. J. De Bruijn Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis. 1996, World J. of Microbiology & Biotechnology 12, pp: 163-164.

Sicardi, M., García-Prechac, F., Frioni, L. Soil microbial indicators sensitive to land use conversión from pastures to commercial *Eucalyptus grandis*. (Hill ex Maiden) plantations in Uruguay. 2004. Appl. Soil Ecology 27:125-133.

Smith, O.H., Petersen, G.W., Needelman, B.A. Environmental indicators of agroecosystems. 2000, Adv. Agron. 69:75-97.

Tabatabai, M. A., Soil Enzymes. En: R. W. Weaver, Ed. **Methods in Soil Analysis,** Part 2: Microbiological and Biochemical Properties, 1994, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin: 775-833.

Torsvik; V., Goksoyr, J. y Daae, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. 1990, Appl. Environ. Microbiol. 56:782-787.

Van Bruggen, A. H. C., Semenov, A .M. In search of biological indicators for soil health and desease suppression. 2000, Appl. Soil Ecol 15(1): 13-24.

Preguntas de repaso

1) Concepto general de ecología microbiana.
2) Señale dos ecosistemas diferentes por su tamaño y diversidad biológica, analice las fuentes de energía y de nutrientes y las poblaciones microbianas dominantes.
3) ¿Por qué la población microbiana del suelo es tan diversa en composición?
4) Señale ejemplos de poblaciones autóctonas y zimógenas en una campo con pradera natural y en otro suelo que recibe residuos de cosechas.
5) Analice las causas de las diferencias de las velocidades de crecimiento de un microorganismo (celulolítico) en el suelo y en medio de cultivo.
6) Analice y de ejemplos de interacciones biológicas en el ecosistema suelo-planta-microorganismos.
7) ¿Qué fracción del suelo está en directa relación con la actividad biológica y por qué?
8) Señale técnicas de estudio a aplicar para incluir a aquellos microorganismos “no cultivables”.
9) En caso de la actividad respiratoria, ¿cómo evaluaría las actividades reales y las potenciales?
10) Biomasa microbiana: concepto y explique el fundamento de dos técnicas a aplicar para su evaluación.
11) Indique alguna técnica que permita determinar la estructura de una comunidad microbiana basada en el análisis de sus ácidos nucleicos.
12) Ejemplos de procesos oxidativos en los ciclos biogeoquímicos y sus consecuencias ecológicas.
13) Idem con los procesos reductivos.
14) ¿Qué procesos ocurren prácticamente en todas las condiciones ambientales compatibles con la vida? Consecuencias en el ecosistema.
15) Indique procesos de solubilización y de precipitación de elementos realizados por los microorganismos y sus consecuencias en la nutrición vegetal.

9 Ciclo biológico del carbono

La figura 1 muestra las transformaciones que sufre este elemento en ecosistemas terrestres.

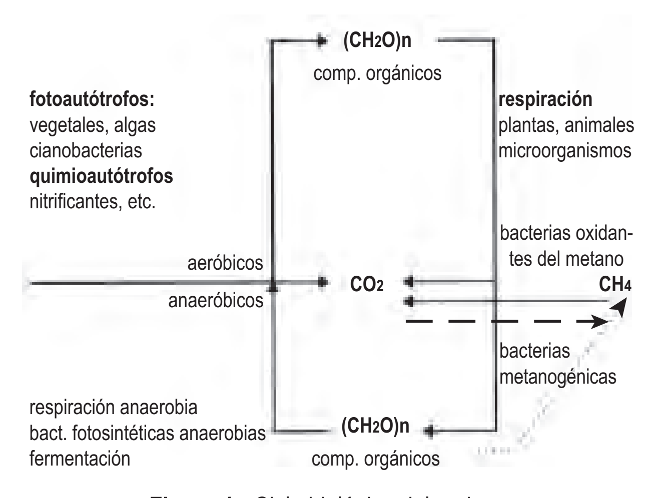


Figura 1- Ciclo biológico del carbono

A nivel mundial, el carbono se cicla a través de los 4 depósitos principales de C: la atmósfera, los suelos, los océanos y otros ambientes acuáticos, así como los sedimentos y las rocas (cuadro 1). El mayor depósito se encuentra en los sedimentos y las rocas de la corteza terrestre, pero el tiempo de renovación es demasiado largo, insignificante a escala humana.

Desde el punto de vista de los organismos, una gran cantidad de carbono se encuentra en las plantas terrestres (fijación del CO_2). Sin embargo hay más carbono en la materia orgánica muerta (**humus**) que en los organismos vivos. Las formas más rápidas de transferencia global del carbono son por vía del CO_2 de la atmósfera. Este constituye un depósito muy importante, pero su tiempo de residencia es muy corto.

Cuadro 1- Flujos de carbono en ecosistemas terrestres

X 10^9 toneladas	Total	Flujo
Reservas globales	1.000 x 10^6	
Carbonatos en corteza terrestre	~8	
# # Terrestre		
Combustibles fósiles	5.000	
Carbonatos del suelo	800	
Materia orgánica del suelo	1.500	
Plantas/animales	830	
Fotosíntesis		+120
Respiración		-60
Pérdidas netas/vegetación		-2
# # océanos		
sedimentos	36.700	
carbonatos	725	
Balance atmosférico		
Atmósfera	720	-2

Este ciclo no es muy complejo: la fotosíntesis y la quimiosíntesis autótrofa y la respiración y/o fermentación son los principales procesos en que están involucrados los compuestos carbonados.

Carbono en suelos, agua y atmósfera

El contenido de carbono de los **suelos** varía, como es de

suponer, con los tipos pedológicos, regiones climáticas, prácticas de manejo, vegetación, etc. Los valores oscilan entre 1-3% en suelos minerales, entre 6-10% en praderas y en turbas, los valores superan 30-40% del peso seco. En las células, el carbono constituye un 40 al 50% del peso seco de las mismas.

La fuente principal de este elemento se encuentra en la atmósfera, la que a pesar de contener bajo nivel de CO_2 (0,03%) alberga sobre la tierra cantidades enormes de este gas ($7{,}0x10^{14}$ kg). El incremento sobre los valores actuales preocupa por el hecho de que tanto el CO_2 como el CH_4 provocan incrementos de temperatura en la atmósfera (calentamiento global) (cuadro 2).

Cuadro 2- Calentamiento global

- Desde 1900 los niveles atmosféricos de CO_2 se han incrementado de 280 a 350 ppm, los de metano 12-13 ppb año^{-1} y los fluorocarbonos sobre 3% año^{-1}
- Consecuencias:
  - Mayores niveles de CO_2 estimulan la productividad, fijando C a residuos de suelo y materia orgánica
  - La continua deforestación y la expansión agrícola reducirá el C en plantas y suelos
  - Aumentos de temperatura favorecerán la actividad metabólica en suelos y pérdidas de C
  - Rangos corrientes de pérdidas en suelos tropicales serán 10X que en los suelos templados
  - Cambios en la adaptación de especies y uso de la tierra
  - Influencias en diferentes prácticas agrícolas

Carbono en aguas: su contenido varía con la naturaleza de los causes de aguas y con la deposición que vierten sobre ellos. Así, en los ríos la cantidad de materia orgánica puede ser muy grande y llegar a polucionarla si recibe aguas servidas domiciliarias, efluentes de la industria, desechos agrícolas.

Una parte del carbono puede depositarse como carbonatos insolubles, constituyendo verdaderos depósitos de este elemento, pero los procesos de solubilización son muy lentos y estas fuentes no inciden en el ciclo global.

Primera etapa del ciclo: fijación del CO_2 o CH_4

La reducción del CO_2 la realizan los organismos **autotróficos: foto y quimiosintéticos**

- en primer lugar los vegetales
- las algas
- las cianobacterias, las bacterias fotosintéticas
- bacterias quimioautótrofas

Estas últimas emplean la energía liberada en la oxidación de los compuestos minerales, como el amonio, sulfuros, iones ferrosos, H_2, para reducir el CO_2. Si el ambiente fuera rico en CH_4 como consecuencia de procesos de anaerobiosis, serán los microorganismos **metanotróficos** los encargados de convertirlo en metanol para luego asimilarlo en su biomasa (cuadro 3).

Cuadro 3- Oxidación del metano en ecosistemas naturales

- Representa el 44% del C del suelo
- CH_4 es 20 veces más efectivo que el CO_2 como gas con efecto invernadero: su oxidación es muy importante
- Mucho mayor si no actuaran los metanotróficos: oxidan el 90% del CH_4 luego de su emisión
- Rellenos sanitarios generan el 10% del CH_4 liberado. Al cubrir con suelo se requieren 2-3 años para desarrollar una fuerte población metanotrófica
- *Methylobacter:* bacterias aerobias, Gram$^-$ con sistema de membranas internas. Colonias a veces rosadas
- Metabolizan tanto metano (metanotróficas) o $-CH_2O$ (metilotrófica) como única fuente de C
- También oxidan NH_3, pero no como única fuente de energía
- Los pasos de oxidación necesitan metil monooxigenasa
- Organismos de la rizosfera y de hojas en plantas acuáticas
- Contaminantes frecuentes en tejidos vegetales

Estos **productores primarios** (PP) de materia orgánica

contribuyen a incrementar su nivel en ecosistemas naturales que constituye la fuente de nutrientes y de energía para la mayoría de los habitantes del suelo, que son heterótrofos. Los valores citados sobre el aporte del carbono en la tierra por la fotosíntesis vegetal ($9,0x10^{13}$kg) son seguramente superados en lagos y océanos.

Segunda etapa: mineralización

La materia orgánica que llega al suelo a través de residuos de cosechas, la percolación en el follaje, las raíces y sus productos de descamación y exudación, los restos animales y microbianos sufren una serie de procesos de degradación, que aseguran la continuidad de los ciclos geoquímicas (cuadro 4). Los procesos degradativos bioenergéticos realizados por los microorganismos dependerán del nivel de O_2 (cuadro 5). Los procesos se realizan en:

- **aerobiosis:** respiración y algunas fermentaciones, como la láctica que no se afecta por el O_2
- **anaerobiosis**: fermentaciones y respiraciones anaerobias (sulfatos, nitratos, CO_2, Fe^{+++}, como aceptores de electrones). La actividad de los organismos del suelo devolverían a la atmósfera un 40-75% del carbono fijado. La diferencia con la productividad primaria, o sea la **productividad neta**, podría llegar a $2,0 \times 10^{13}$ kg de C orgánico/año.

Esta cifra debe mineralizarse en el mismo período, de otro modo la gran reserva de la atmósfera se agotaría rápidamente (unos 7 años, cuadro 1). Son los consumidores primarios (herbívoros) y los secundarios (carnívoros) y finalmente el hombre, los que aseguran una débil mineralización. Los consumidores primarios no mineralizan más de un 10% de la productividad primaria, devolviendo al suelo importantes fracciones de materia orgánica, como producto de desecho, y los carnívoros, sólo mineralizan 1/100 de ella.

Se presume que la cantidad de materia orgánica proveniente de animales y microorganismos es pequeña en el suelo en relación a la biomasa vegetal (cuadro 4). La biomasa de los principales grupos de invertebrados en suelos de pastura ha sido calculada en unos 2.300 kg/ha, mientras que se ha estimado en 4.500 kg/ha la biomasa de bacterias u hongos en la capa arable.

La distribución de estos grupos difiere; la microfauna se localiza más en el mantillo, mientras que los microorganismos migran a todo el perfil.

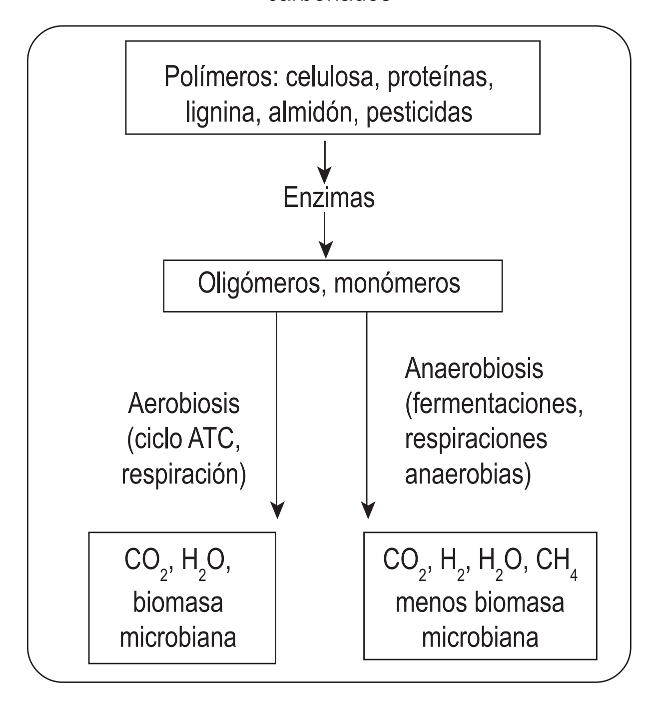
Resumiendo: los procesos microbianos que dominan en las transformaciones del carbono en la naturaleza son:

- **mineralización-inmovilización**
- **óxido-reducción**
- **solubilización-precipitación (caso de los carbonatos en depósitos en suelos y aguas)**

Cuadro 4- Naturaleza de compuestos orgánicos carbonados en ecosistemas naturales

- **Restos vegetales**
  - citoplasmáticos: azúcares, proteínas y ácidos nucleicos
  - reserva: proteínas, grasas, almidón,glicógeno
  - componentes estructurales: celulosa, pectina, lignina
- **Restos animales**
  - citoplasmáticos: como arriba
  - de reserva: almidón, proteínas y grasas
  - estructurales: quitina. proteínas de pelos y uñas; mucopéptidos; material fecal
- **Residuos microbianos**: según el organismo: peptidoglicano, mananos, proteínas, etc.
- **Materia orgánica del suelo**
  - ácidos húmicos y fúlvicos, polisacáridos, enzimas, polucionantes

Cuadro 5- Vías degradativas en compuestos carbonados



Biodegradación de moléculas orgánicas

Para facilidad en el estudio dividiremos a la materia orgánica en dos categorías.

La materia orgánica fresca, constituida por los aportes de la vegetación, hojas, tallos, raíces, exudados, células microbianas muertas y restos de animales. Todos estos componentes, de origen biológico, son sometidos a una serie de procesos que conducen a su biodegradación con participación de equipos enzimáticos especializados de los microorganismos. La fauna ejerce un efecto acelerador del proceso, reduciendo el tamaño de las partículas (acción abrasiva o de molienda).

La materia orgánica nativa o humus, formada por procesos de descomposición y resíntesis posee estructura diferente a la materia orgánica original. Su estabilidad frente a la descomposición es mayor que los demás componentes orgánicos del suelo.

Analizaremos las distintas categorías de moléculas contenidas en la materia orgánica fresca, cuya complejidad química condicionará en parte la actividad biológica y por lo tanto, su biodegradación y más adelante aspectos de la humificación y mineralización de estas moléculas complejas.

El cuadro 6 presenta composición química de algunos organismos y tejidos. Las mayores diferencias se encuentran entre las sustancias encargadas de mantener la estructura celular y el cuadro 7 muestra las fracciones de la materia orgánica, las enzimas y productos finales en su degradación.

Cuadro 6- Composición química de algunos organismos y tejidos

	g/100 g peso seco			
	Células levadura	**Tejido vegetal**	**Músculo mamífero**	**Tegumento insecto**
Mananos y glucanos	28	?	-	-
Quitina	?	-	-	25-55
Celulosa	-	15-60	-	-
Hemicelulosas	-	10-30	-	-
Lignina	-	5-30	-	-
Proteínas y ácidos nucleícos	24	2-15	80	25-37
Aminoácidos	1,3	?	?	?
Ácidos alifáticos	?	5-30	4,8	?
Azúcares solubles	0,5	?	?	?
Glicógeno	18	-	2,0-7,2	-
Lípidos	9	1-25	5,2	4-5
Cenizas	17	1-13	4,4	1
no determinados	2,2	?	?	pigmentos, fenoles,etc.

Métodos de estudio

El análisis de la biodegradación de una sustancia orgánica se realiza por alguno de los métodos de estudio discutidos en el capítulo 8 y en el Anexo práctico, es decir: actividad respiratoria, análisis de enzimas involucradas en los procesos, pérdida de peso de los sustratos incorporados al suelo, aparición de productos del metabolismo, recuentos de grupos fisiológicos.

La figura 2 (Sylivia *et al.*, 1998) muestra el incremento en poblaciones zimógenas de bacterias y hongos luego de la

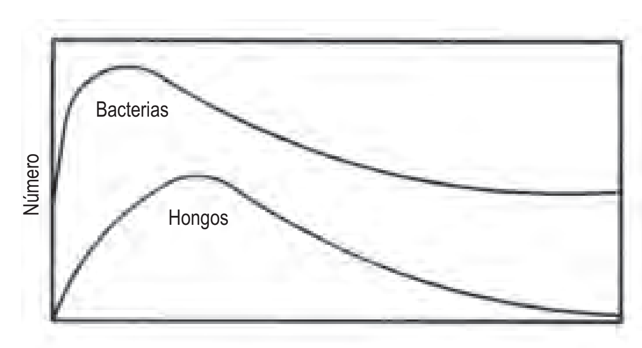
adición de sustratos orgánicos carbonados a un suelo y el desprendimiento de CO_2 del sustrato, del suelo y a partir de la degradación de la biomasa microbiana de células muertas. Nótese que para discernir entre las tres fuentes es necesario marcar el sustrato por ejemplo con C^{14}. A medida que los sustratos se van agotando, la micropoblación decae y puede llegar al viejo equilibrio o a uno nuevo.

Cuadro 7- Principales componentes de la fracción orgánica del suelo, las enzimas actuantes y los productos formados

Componentes	Enzimas	Productos
Celulosa Hemicelulosa	celulasa, glucosidasas hemicelulasas	ác. orgánicos, azúcares, ácidos urónicos
Pectina	pectinmetilesterasa galactouronasa	ác. péctico, etanol ác. galactourónico, glucosa, arabinosa
Almidón	amilasas, glucosidasas	glucosa, maltosa
Quitina	quitinasa, quitinobiasa	glucosamina, ác. ácético, glucosa, NH_3
Ac.nucleícos	nucleasas, nucleosidasa nucleotidasa, amino-hidrolasa	bases nitrogenadas, PO_4^{-3}
Proteínas y péptidos	proteinasa, peptidasa, deshidrogenasas y oxidasas	aminoácidos, ácidos orgánicos, NH_3
Ésteres fosfatados	fosfatasas, fitasas	alcohol, inositol, HPO_4^{-2}
Ésteres sulfatados	arilsulfatasa	alcohol, $SO_4^{=}$
Lignina	lacasa, peroxidasa fenoloxidasa	ácidos aromáticos, compuestos fenólicos

Los estudios se realizan en:
in vitro, en condiciones controladas, cuando se desea conocer el efecto de algún factor de interés, en sistemas estáticos o mediante la técnica de percolación y/o

in situ, en el campo, siguiendo desaparición de sustancias y/o aparición de productos finales.



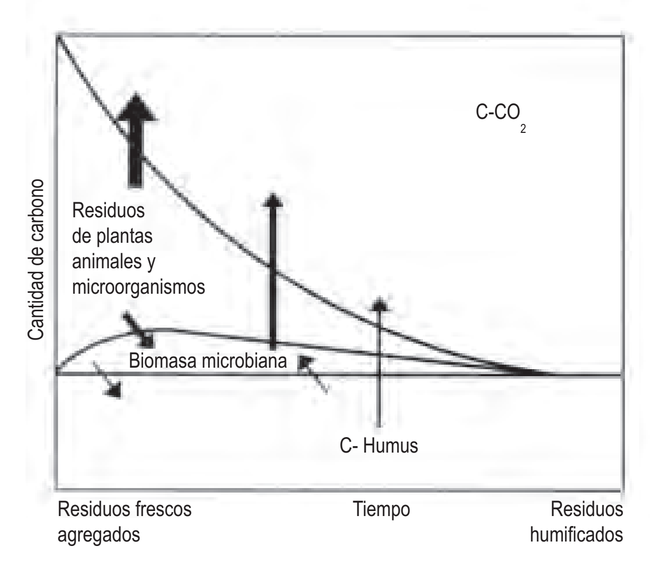


Figura 2- Respuesta microbiana y evolución del CO_2 luego de la adición de materiales carbonados

Cuadro 8- Factores que afectan la degradación de materiales carbonados orgánicos

- Composición del sustrato: los microorganismos emplean compuestos solubles de N, S y micronutrientes para su síntesis. Necesidad de relaciones C/N/S/P de 100/10/1/1 aproximadamente
- Prácticas agrícolas: fertilización incluyendo abonos verdes
- Cultivos/manejo, irrigación, encalado
- Características físicas y químicas del suelo
- Disponibilidad de O_2
- Agua (exceso)
- pH
- Temperatura

Glúcidos

Azúcares simples y oligósidos

Estos compuestos llegan al suelo o se originan en él por síntesis y degradación de poliósidos. Representan menos del 2% del carbono total del suelo y su presencia es muy efímera, excepto tal vez, en el caso de la sacarosa (remolacha o caña).

Su concentración en el suelo refleja el equilibrio entre las velocidades de aparición y degradación. Distintas vías metabólicas han sido reconocidas en los suelos: la de la glicólisis (exosa di-fosfato), el ciclo de la exosa monofosfato (Enter-Doudoroff), que originan azúcares de 3, 4, 5 ó 6 carbonos. En la célula microbiana, los glúcidos proveen de energía y subunidades para su biosíntesis. La gran mayoría de los microorganismos del suelo pueden emplear los **ácidos orgánicos** producidos por oxidaciones de hidratos de carbono y proteínas, de modo que el nivel de ácidos orgánicos de cadena simple es muy bajo y sólo pueden acumularse en condiciones de anaerobiosis.

Poliósidos de reserva como almidón, glucógeno o los provenientes de paredes celulares: celulosa, hemicelulosas y compuestos pécticos, polímeros de aminoazúcares, como la quitina.

Sustancias aromáticas: simples como los fenoles, o polimerizadas como los taninos o la lignina.

Constituyentes hidrófobos: ceras, cutina, grasas.

Almidón

Representa una reserva para los vegetales que se encuentra transitoriamente en hojas y es movilizado hacia los tallos, bulbos, rizomas, frutos y semillas. Integra en pequeña proporción las paredes de algas. Como es movilizado en las células antes de la muerte llega al suelo en poca cantidad. Está formado por **amilosa y amilopectina**; el primer componente posee estructura lineal, con varios cientos de unidades glucosa unidas por enlaces glucosídicos α 1-4. En la amilopectina se presenta esta misma organización, pero la molécula es ramificada, con cadenas laterales unidas por enlaces α 1-6. El almidón contiene un 70-90% de amilosa, pero esta proporción varía en distintas especies vegetales.

La biodegradación en el suelo es rápida, superando a la velocidad de la desaparición de la celulosa, hemicelulosa y otros polisacáridos, y se realiza tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (liberación de ácidos orgánicos y metano).

Microflora

La microflora amilolítica de los suelos es abundante, los recuentos en medio sólido presentan valores de 10^5 a 10^7/gramo de suelo. Una multiplicidad de bacterias poseen las enzimas específicas, y son Gram positivas o negativas, esporuladas o asporógenas, aerobias o anaerobias. Numerosos actinomicetes pueden emplear este polisacárido así como muchos hongos filamentosos. Otros sustratos pueden ser empleados por estos microorganismos, incluida la celulosa.

La hidrólisis es catalizada por **amilasas** (α glucosidasas) inducibles: se reconocen tres tipos: **la α, la β amilasa y una glucosidasa.**

La α **amilasa** es una endoenzima que actúa al azar sobre amilosa y amilopectina. Con amilosa se acumulan grandes cantidades de maltosa y pequeñas cantidades de glucosa y del trisacárido maltotriosa. En la amilopectina esta enzima detiene su hidrólisis en las ramificaciones, acumulándose fracciones de alto peso molecular (dextrinas). La **β amilasa** es exoenzima, actuando desde los extremos de la molécula, liberándose maltosa y dextrinas. Al llegar a una ramificación se detiene la hidrólisis. Otros organismos poseen otra exoenzima, la **α amilo 1-6 glucosidasa (glucoamilasa)** capaz de hidrolizar la molécula en puntos de ramificación, liberando al medio dextrinas y oligosacáridos; los que no permanecen mucho tiempo en el suelo pues otras enzimas los llevan a glucosa, asimilada por las células.

Estas enzimas son **inducibles,** pero la habilidad para producirlas depende del tipo de almidón de diferentes especies vegetales. La naturaleza exocelular las hace sensibles al ambiente y pueden ser muy adsorbidas por |os coloides. Los azúcares simples solubles penetran en la célula donde son metabolizados.

Ecología

Fuera de los casos descriptos de inhibición de la degradación por adsorción de enzimas, el almidón es descom-

puesto en todos los ambientes por acción de una microflora poco específica. Los productos finales dependerán no solamente de la microflora dominante sino también de las condiciones ecológicas. Algunos autores han señalado velocidades diferentes de degradación según el origen del almidón: el de arroz parece ser atacado por un gran número de microorganismos.

Inulina

Constituye otro polisacárido de reserva, formado por unidades de fructosa (25-28), unidos a la cadena lateral por enlaces 2-1. Numerosos microorganismos: bacterias, actinomicetes, hongos, poseen **inulasa**, exoenzima que libera un disacárido de fructosa. Su degradación ocurre simultáneamente con la del almidón.

Glúcidos de paredes celulares

Las paredes celulares de los vegetales superiores poseen una estructura compleja que al ser tratada con lejía de soda (NaOH al 17,5%) libera glúcidos secundarios: las mal llamadas hemicelulosas y compuestos pécticos, dejando un residuo insoluble formado por celulosa y distintas proporciones de lignina, la que a medida que la planta envejece va invadiendo las paredes primarias y secundarias a partir de la lámina media.

Los restos vegetales cuando llegan al suelo están formados en gran parte, salvo en el caso de la incorporación de abonos verdes, por **paredes celulares.** La celulosa, hemicelulosas, pectinas y lignina representan aproximadamente el 45% de la materia seca en centeno joven y alfalfa en floración, 55% en acículas de pino, alcanzando un 75% en paja de centeno luego de la cosecha, como se aprecia en el cuadro 9 y en la figura 3.

Las paredes de los microorganismos contienen distintos polisacáridos: los hongos primitivos poseen celulosa que luego es reemplazada por quitina y otros poliósidos con o sin nitrógeno, comparables por su solubilidad a las hemicelulosas de los vegetales. Especies filamentosas contienen en sus paredes pigmentos amorfos y oscuros, las **melaninas**. En las bacterias, el **péptidoglicano** formado por aminoazúcares y péptidos está acompañado en las Gram positivas por ésteres fosfatados, los ácidos teicoicos y lipoproteínas y lipopolisacáridos en las Gram negativas.

Cuadro 9- Composición química de distintos vegetales

Constituyentes	% materia seca al aire centeno jóven	alfalfa	acículas de pino
Grasas y ceras	2,35	10,41	23,92
Solubles en agua	29,54	17,24	7,29
Hemicelulosas	12,67	13,14	18,98
Celulosa	17,84	23,65	16,43
Lignina	10,61	8,95	22,68
Proteínas	12,26	12,81	2,19
Cenizas	12,55	10,30	2,51

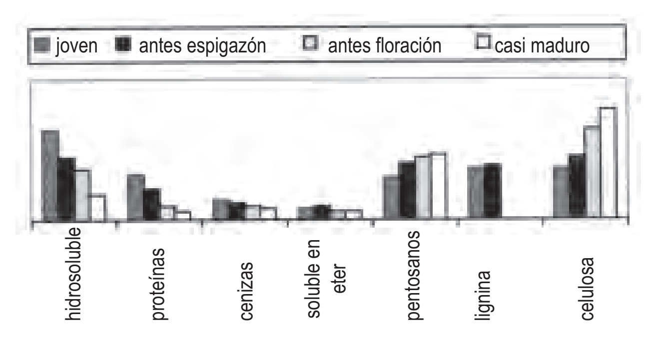


Figura 3- Efecto de la edad en la composición química de la cebada

Celulosa

Como vimos, la celulosa es uno de los constituyentes vegetales más importantes, representando un 15% del peso seco de leguminosas y gramíneas jóvenes y más de 50% en materiales leñosos (en promedio representa 1/3 del CO_2 fijado por las plantas). Sin embargo, los análisis de suelos indican que sólo representa una pequeña fracción (menos del 1%) de la materia orgánica.

La **celulolisis** tal vez constituya la etapa mejor conocida del ciclo del carbono. Las investigaciones en estos aspectos han sido estimuladas por los graves problemas ocasionados por los microorganismos celulolíticos en la industria textil y papelera. Se calcula que anualmente unas

10 millones de toneladas de carbono se fijan como celulosa, cantidad que los suelos deben degradar en el mismo período.

La celulosa está constituida por unidades de glucosa, unidas en largas cadenas por enlaces **β 1-4 glucosídicos.** Pueden presentarse entre 2.000 a 10.000 y hasta a veces más de 15.000 unidades de glucosa en la molécula, según la especie vegetal. La estructura física también varía, las cadenas se reúnen en microfibrillas entre las cuales se distinguen mallas cristalinas separadas por regiones amorfas. Las mallas están fuertemente unidas por puentes H o por fuerzas de Van der Waals. Según la estructura, la orientación de las fibrillas, la proporción de constituyentes secundarios, la celulosa se comporta diferentemente frente a la biodegradación.

Además, los tratamientos mecánicos a que se somete a las preparaciones industriales afectan la biodegradación: papel, celofán, celulosa precipitada, carboximetilcelulosa (CMC) son empleados en los medios de cultivo, o llegan al suelo. Estos preparados difieren en estructura y propiedades físicas de la celulosa natural.

Microorganismos

Este polisacárido es hidrolizado por un complejo enzimático, no completamente caracterizado, conocido como **celulasa**, presente en una variedad de bacterias, actinomicetes, hongos y protozoos. Las especies celulolíticas no son muy numerosas dentro de cada grupo. El cuadro 10 presenta las características de los microorganismos celulolíticos.

La celulosa es en ocasiones degradada más rápidamente en cultivos mixtos, aun cuando los organismos asociados sean incapaces individualmente de atacar el polisacárido. La microflora primaria se favorece por la remoción de los productos de la degradación o por la eliminación de sustancias inhibidoras (**comensalismo).**

Las bacterias son activas degradadoras, algunas especies actúan como celulolíticos verdaderos (atacan a la celulosa nativa) como los géneros *Cytophaga y Sporocytophaga*. Dentro de los *Actinomycetales* numerosos *Streptomyces* son capaces de emplear celulosa como

Cuadro 10- Microflora celulolítica

Grupo	Orden	Género	Ecología
bacterias	*Pseudomonadales*	*Vibrio*	aerobios, en mantillos, mesófilos
		Cellvibrio	termófilos, con pigmentos
	Eubacteriales	*Cellulomonas*	aerobios, G-, bacilos pigmentados
		Bacillus	aerobios, a veces pleomórficos
		Clostridium	anaerobios, suelos inundados, turbas
	Mixobacteriales	*Cytophaga*	bacilos aerobios, en suelos con pajas
		Sporocytophaga	o abonos orgánicos
	Actinomycetales	*Streptomyces*	crecen en agar mineral con celulosa,
		Micromonospora	halo de hidrólisis, pigmentos
		Nocardia	
protozoos		*Hertmella*	descomponen celulosa en cultivo puro. Importantes en el rumen, menos en el suelo
hongos	*Ascomycetes*	*Rhizoctonia,*	activos degradadores de la celulosa,
		Humicola,	dominan en ambientes ácidos,
		Botrytrichum	en mantillos de bosques.
		Alternaria,	También se encuentran en el rumen
		Rhizopus	

fuente de carbono y energía, pero actúan como pobres competidores frente a otros grupos microbianos.

Los hongos son activos degradadores en ambientes desfavorables para las bacterias: pH ácidos, alta humedad. Numerosas especies participan en la degradación de la fracción lignocelulósica de restos vegetales.

Los protozoos son activos degradadores en el rumen, en anaerobiosis; en el suelo y aguas prefieren la fagocitosis de pequeños organismos.

Celulolisis: Las bacterias se observan a nivel de las regiones amorfas, pero no penetran en el lumen de las fibras salvo que éstas estén lesionadas. Los hongos pueden atravesar las paredes a nivel de puntuaciones o fisuras: las fibras se hinchan y se observan estrías profundas. Cambia la reacción frente al iodo, se altera la estructura física y el material se transforma en una masa muscilaginosa hasta su desaparición total.

La **celulasa** cataliza la conversión de la celulosa insoluble en mono, di, tri o tetrasacáridos. Los dos primeros son solubles en agua y penetran en la célula integrando las vías metabólicas que rinden energía o proveen de subunidades para sus macromoléculas. La figura 4 esquematiza la degradación. Se han determinado hasta 14 com-

ponentes en el complejo enzimático, organizados en cuatro tipos básicos de enzimas:

- **C_1**, pobremente caracterizada, actúa sobre la celulosa nativa y la contienen los organismos denominados celulolíticos verdaderos. Está integrada por proteínas con ligeras diferencias estructurales entre los distintos grupos microbianos.
- **Cx**, complejo enzimático de acción β 1-4 glucanasa, no hidroliza la celulosa nativa sino que ataca a los polímeros parcialmente degradados y está muy distribuida entre los hongos, bacterias y actinomicetes. La hidrólisis incluye adición de agua al sustrato insoluble con rupturas de enlaces entre azúcares.

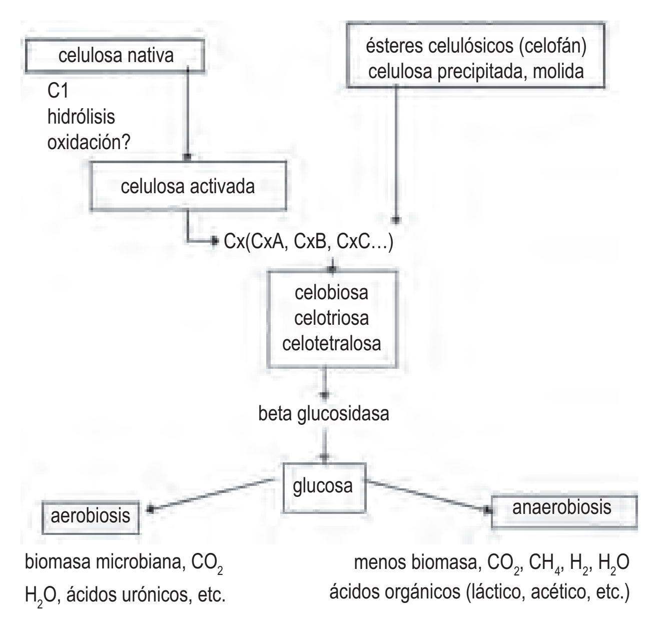


Figura 4- Celulolisis

La acción se realiza al azar (acción endoglucanasa), liberándose productos solubles como la celobiosa, aunque los productos finales dependen del tipo de organismo (otros oligosacáridos y a veces glucosa).

Si el ataque se produce desde los extremos de la molécula (acción exoenzimática), la celobiosa es el producto dominante. Estos términos no deben confundirse con la acción a distancia de la célula productora (la C1 y Cx deben actuar extracelularmente dada la insolubilidad de los sustratos y sus grandes dimensiones).

- **β glucosidasa** que cataliza la última etapa de la degradación, es una hidrolasa que lleva la celobiosa, celotriosa y otros oligosacáridos de bajo peso molecular hasta glucosa. El antiguo término de celobiasa es inapropiado pues la celobiosa no constituye su único sustrato.

En la mayoría de los organismos el **sistema celulasa es inducible** y se sintetiza en presencia de celulosa y carbohidratos relacionados y está sometida a represión catabólica, los productos de la reacción inhiben o reprimen la síntesis de la enzima. Por la acción extracelular, esta enzima está muy sometida a factores del medio. Un alto contenido de arcillas puede inactivarla, fenómeno que junto a la adsorción del sustrato puede explicar en parte el efecto protector de la montmorillonita sobre materiales celulósicos.

Ecología

Entre los factores más importantes que afectan a este proceso en la naturaleza citaremos el nivel de nitrógeno disponible, la temperatura, aireación, humedad, pH, presencia de otros carbohidratos en los restos.

Nitrógeno: la aplicación de N-inorgánico estimula la celulolisis, hecho explicable ya que la celulosa no contiene este elemento y la microflora lo requiere junto a otros minerales para satisfacer sus necesidades plásticas.

La figura 5 muestra el empleo de diferentes fuentes de nitrógeno por la microflora celulolítica y la figura 6 el efecto de dosis crecientes de fertilizante nitrogenado. Altas dosis, donde el nitrógeno agregado supera el requerido, no incrementan la degradación, pues otros son los factores limitantes del proceso.

Los microorganismos requieren una parte de nitrógeno por cada 35 partes de celulosa, datos que reflejan el hecho de que 3 partes de nitrógeno se incorporan al citoplasma microbiano por cada 100 partes de celulosa descompuesta (5-10% N) posibilitando la síntesis de 30-60 unidades de biomasa.

En algunos suelos el fósforo puede ser factor limitante del proceso.

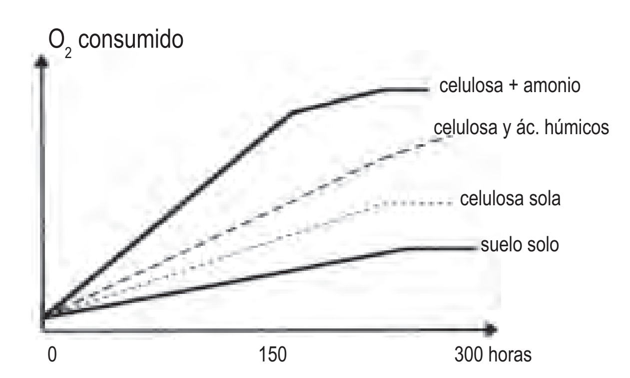


Figura 5- Efecto de agregado de nitrógeno en la celulolisis

Temperatura: el proceso ocurre desde temperaturas cercanas al punto de congelamiento hasta aproximadamente 65ºC. Los aumentos de temperatura inducen variaciones en la composición de la población con incrementos de la velocidad de degradación. En el rango termófilo son *Clostridium*, actinomicetes y hongos, las poblaciones dominantes, aunque estos organismos son considerados más bien como mesófilos resistentes. En el suelo la mayoría de las especies son mesófilas.

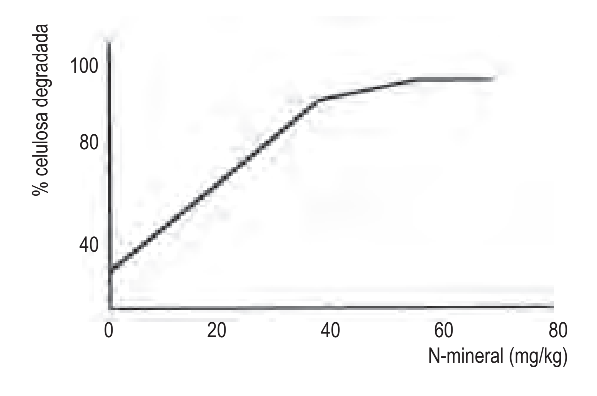


Figura 6- Efecto de dosis creciente de N mineral en la celulolisis

pH: los microorganismos celulolíticos menos afectados por los cambios de pH son las bacterias anaerobias. En general se puede decir que la celulolisis es más activa en suelos bien provistos de bases, neutros y que la composición de especies dominantes varía con este factor. En ambientes ácidos son las bacterias anaerobias y los hongos los grupos dominantes, mientras que los actinomicetes prefieren la neutralidad o escasa basicidad.

Resulta evidente que el encalado de suelos ácidos estimula el proceso.

Humedad y aireación: como vimos, la microflora específica puede ser aerobia o anaerobia, de modo que el nivel hídrico de los suelos condicionará la actividad de cada uno de estos grupos. Por su rendimiento energético el proceso es más lento en ambientes anegados o en suelos con pobre intercambio de gases.

El cuadro 11 muestra el efecto del pH y de la aireación del suelo en el coeficiente de mineralización del carbono (a) y del cultivo y la profundidad (b).

Como puede apreciarse, un pH neutro y condiciones de buena aireación en los suelos favorecen a este proceso. Las bacterias serán en estas condiciones los agentes dominantes de la celulolisis. El proceso disminuye con la profundidad en correlación directa con el descenso de la actividad biológica y del nivel de materia orgánica. Los cultivos son fuente permanente de celulosa a nivel rizosférico por la descamación y muerte de tejidos.

Cuadro 11- Efecto de algunos factores en la celulolisis

a) pH y aireación

pH	aereación	% celulosa degradada en 15 días	coeficiente de mineralización
4,5	aerobiosis	62,5	3,6
	anaerobiosis	14,0	0,1
7,0	aerobiosis	81,2	11,2
	anaerobiosis	21,0	0,15

b) profundidad del suelo y cultivo

profundidad (cm)	% celulosa descompuesta no cultivado	cultivado
0-20	48	91
20-40	16	72
40-60	0	34

Otros nutrientes: se pensaba que los celulolíticos verdaderos (con la enzima C1) no podían emplear otra fuente de carbono y energía que no fuera la celulosa. Pero ac-

tualmente se sabe que la presencia de otras fuentes de carbono más simples favorece a estos microorganismos. Los azúcares simples, los compuestos pécticos o las hemicelulosas, incrementan la actividad celulolítica. La microflora estimulada por el sustrato simple induce la celulasa al agotarse el mismo.

La proporción de lignina en los restos es otro de los factores que afectan a la celulolisis. El cuadro 12 presenta el efecto de dosis crecientes de lignina.

El efecto inhibidor sobre la celulolisis se debería al problema físico resultante de la estrecha unión entre estos dos polisacáridos en las paredes celulares. Las enzimas encontrarían una barrera mecánica. A medida que los restos se enriquecen en lignina la celulolisis se hace más lenta.

Cuadro 12- Degradación de preparaciones de yute con diferentes cantidades de celulosa y lignina (a los 21 días)

Preparado	Celulosa	Lignina	% celulosa descompuesta
A	99,2	0,0	100,0
B	95,5	3,3	95,6
C	89,3	6,3	83,1
D	82,7	11,9	37,9
E	75,6	12,6	17,7

En resumen: este importante proceso biológico que asegura la degradación de la gran masa de celulosa que cada año llega a suelos y aguas es realizado por una microflora variada (bacterias, incluidos los actinomicetes, hongos, protozoos), aunque el número de especies celulolíticas no es muy amplio. El proceso ocurre en todos los ambientes tanto en condiciones de aerobiosis como de anegamiento. En ambientes ácidos dominan los hongos; en los cultivados y neutros, las bacterias; bajo desecación y ligera alcalinidad, los actinomicetes.

La fauna: ácaros, colémbolos, termites, actúan moliendo y macerando a la celulosa nativa, lo que facilita su degradación, pero no poseen celulasas. La microflora de su tracto digestivo puede iniciar la degradación. En aguas el proceso es activo.

Otros polímeros: mananos, xilanos, pectinas

Este grupo incluye a las mal designadas **hemicelulosas**: un conjunto heterogéneo de compuestos formados por una cadena principal poliósida, más o menos larga y en general formada por una misma unidad elemental (pentosa, hexosa). Puede haber ramificaciones en la molécula, a veces muy numerosas, con unidades diferentes a las de la cadena principal (hexosas, pentosas, metiladas o no, ácidos urónicos).

Es más correcto hablar de: **xilanos** (unidades de xilopiranosa con enlaces β 1-4 con o sin cadenas laterales de arabinosa o ácido glucónico unidas al carbono 3), **mananos**, **glucanos**, **galactanos**, en lugar de emplear el término hemicelulosas, y **compuestos pécticos** formados por unidades de ácido galactourónico unidos por unlaces β 1-4. Resulta difícil aislar y purificar cada uno de estos compuestos por su íntima asociación con otras sustancias en los restos vegetales y son muy frecuentes las alteraciones en la estructura durante la extracción. Cuando restos vegetales se incorporan al suelo la fracción hemicelulósica desaparece inicialmente a alta velocidad, pero luego el proceso se hace más lento (cuadro 13).

Cuadro 13- % de descomposición de algunos constituyentes de la paja de cebada, en aerobiosis

Días	Hemicelulosa	Celulosa
0-4	43,5	2,3
4-8	6,5	9,1
8-16	5,4	25,0

La heterogeneidad de esta fracción puede explicar este hecho, las sustancias clasificadas como hemicelulosas no son igualmente lábiles: los xilanos y mananos desaparecen primero, mientras que los galactanos son más resistentes. Además, la microflora sintetiza sustancias de este tipo: glucanos y pentosanos en las paredes de los hon-

gos, mananos en levaduras, glucanos y levanos en cápsulas bacterianas, poliurónidos en *Cytophaga*. Esta síntesis microbiana puede reflejarse en una aparente disminución en la degradación de los polisacáridos vegetales. La degradación puede dificultarse cuando están muy unidas a otras sustancias como a la celulosa.

Muchas **enzimas** están involucradas:
Xilanasas, arabanasas, etc., actuando tanto sobre cualquier punto de la molécula (endoenzimas) o desde los extremos de aquella (exoenzima). Las xilanasas pueden liberar el dímero xilobiosa o xilosa que penetra en las células.

Glicosidasas actúan sobre los disacáridos u oligósidos resultantes de la acción de las enzimas anteriores, liberando azúcares simples o ácidos urónicos metabolizables dentro de las células.

La degradación de estos polímeros está más extendida que la celulolisis.

Glucanasas, que han sido poco estudiadas a pesar de su rol importante en la lisis de los micelios fúngicos. Para aislar a los microorganismos responsables se introducen en el suelo trampas de caolinita con paredes de diversos hongos. La microflora dominante está formada por hongos y actinomicetes.

Mananasas, son producidas extracelularmente por hongos y bacterias, en algunos es constitutiva, en otros inducible y atacan a heteroglicanos con manosa.

Estas enzimas extracelulares sufren degradación biológica y son altamente inhibidas por adsorción a arcillas y como las celulasas, están sometidas a represión catabólica cuando la hidrólisis excede la magnitud de asimilación.

Microflora

Es muy variada: hongos, actinomicetes y bacterias típicas atacan a alguna fracción de este complejo grupo en cultivo puro, empleando el polisacárido como fuente de carbono y/o energía. Trabajos que inoculan microorganismos sobre materiales vegetales esterilizados demostraron que ésta es una actividad muy extendida entre los microorganismos del suelo. La actividad es estimulada cuando además del polisacárido se incorporan azúcares simples y la ecología es similar a la de la celulolisis.

Sustancias pécticas

Se encuentran en la lámina media de las paredes vegetales y su rol es unir las células, aunque también se localizan en paredes primarias y secundarias. Existen diferencias en longitud de la cadena y solubilidad:

- la protopectina, es insoluble en agua
- la pectina, soluble y parcialmente esterificada con metanol
- los ácidos pécticos, son solubles en agua pero no esterificados

Tres enzimas están involucradas en la degradación de estos materiales:

- protopectinasa, que convierte protopectina en pectina soluble
- pectin-metil esterasa, que ataca las uniones metil éster de la pectina para dar ácido péctico y metanol
- poligalactouronasa, que ataca uniones entre unidades de ácido galactourónico tanto de la pectina como de los ácidos pécticos

Muchos organismos del suelo poseen estas enzimas: *Erwinia, Clostridium, Pseudomonas, Rhizobium* y numerosos patógenos que pueden penetrar los tejidos.

La diversidad de grupos microbianos y la habilidad para colonizar una variedad de suelos y sustratos, indica que la microflora pectinolítica es amplia (10^5-0^6/g de suelo), aerobia y anaerobia.

Los hongos y actinomicetes parecen ser los grupos más extendidos. Estas sustancias son atacadas desde el momento en que los restos vegetales llegan al suelo por los primeros colonizadores. Su asociación a otros constituyentes de las paredes pueden protegerlos (celulosa, polifenoles).

Quitina

Este polisacárido está constituido por largas cadenas de **glucosamina**, a diferencia de la celulosa que contiene

glucosa. Constituye un elemento importante del exoesqueleto de artrópodos, paredes de hongos y de algunas algas y huevos de nemátodos. La degradación no está limitada como en los polisacáridos anteriores por el nitrógeno, ya que su molécula posee 6,9% de este elemento. Se obtiene fácilmente glucosa y amonio.

Los quitosanos han perdido los grupos acetilos -$COCH_3$ y están formados por largas cadenas glucosamina ($C_6H_9O_4NH_2$). La quitina llega al suelo por aporte de insectos, hongos y otros integrantes de la comunidad. Si se compara el ataque de películas de quitina y celofán se observa que este último permanece sin degradar por largos períodos de tiempo, mientras que la quitina es colonizada rápidamente (12 días en medio acuático y 12-32 semanas en suelo de bosque).

Numerosos **hongos, bacterias y actinomicetes** son responsables de la degradación. Los actinomicetes dominan en suelos agrícolas, las bacterias en los inundados y los hongos en clima templado y ligera acidez.

Las sustancias aromáticas

El suelo recibe cantidades importantes de sustancias aromáticas que son aportadas por la vegetación o sintetizadas por la microflora, sobre todo por hongos. Estas sustancias están constituidas por heterósidos con aglicona variada:

- **con un solo anillo bencénico**: fenoles, ácidos bencénicos de molécula tipo C_6-C_1 o C_6-C_3, como en cumarinas y ácidos cinámicos
- **con dos anillos bencénicos** unidos por una cadena de tres carbonos o un heterociclo oxigenado (C_6-C_3-C_6): antocianos, flavonas, chalconas
- **compuestos fenólicos condensados**: lignina, taninos, sustancias húmicas.

Entre los productos de síntesis microbiana se encuentran fenoles simples, pigmentos de estructura variada y ciertos antibióticos

.

El anillo bencénico es una estructura bastante estable:

- su oxidación puede conducir a la apertura del ciclo dando ácidos alifáticos que serán metabolizados en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (figura 7)
- su condensación da lugar a la formación de sustancias coloreadas, del tipo del humus

Las enzimas son **oxigenasas** que catalizan la fijación del oxígeno al sustrato y **oxidasas** que transfieren al oxígeno los electrones del sustrato con formación de agua. Los compuestos aromáticos simples son llevados al estado de difenoles. La degradación de flavonoides en C_6-C_3-C_6 es menos conocida y son más resistentes a la degradación.

La apertura del anillo está asegurada por **dioxigenasas** que fijan los átomos de una molécula de oxígeno al sustrato; la ruptura puede hacerse entre dos funciones fenol en posición orta o bien en meta. La figura 7 muestra algunos de los posibles caminos en la degradación.

Los procesos de condensación oxidativa son de importancia considerable pues conducen a la formación de taninos, melaninas, sustancias húmicas. Las enzimas, no bien caracterizadas, se clasifican en dos grupos: la **lacasa** y la **tirosinasa** que oxidan fenoles con formación de radicales libres que pueden condensarse entre ellos dando origen a productos oscuros, muy polimerizados. Bacterias, levaduras, hongos filamentosos producen en el laboratorio sustancias condensadas del tipo de las moléculas húmicas.

En resumen: la apertura del ciclo conduce a mineralización y la condensación oxidativa a la acumulación de polímeros resistentes que protegen a otras sustancias de la biodegradación. El nivel de oxígeno es de gran importancia: en anaerobiosis el anillo bencénico no es degradado, *Arthrobacter* no produce pigmentos pardos si no es cultivado en baja presión de O_2 en aerobiosis la degradación puede ser completa.

La importancia de los fenoles en el suelo es más cuali que cuantitativa: el nivel de carbono involucrado en estas combinaciones es bajo, pero constituyen moléculas de gran actividad biológica. Los polifenoles son responsables de la resistencia de vegetales a hongos parásitos y están involucrados en fenómenos de **alelopatía** - una especie vegetal inhibe la germinación o el crecimien-

to de otra-. Por ejemplo, pocos ppm de cumarina en el suelo pueden inhibir el desarrollo de raíces de numerosas especies. También ejercen efectos tóxicos sobre la microflora del suelo.

ácido protocatéquico → ácido β carboximucónico → ácido β cetoadípico → ácido acético + ácido succinico

ácido picolínico; ácido fórmico y ác. OH cetovalérico → acetaldehído y ácido pirúvico

Figura 7- Modalidades de apertura del anillo bencénico

Lignina

La lignina constituye otro polímero natural muy importante responsable del 25% de la fitomasa seca producida anualmente en la biosfera. Se encuentra en tejidos esenciales como el xilema y el esclerénquima y también en hongos como *Humícola, Aspergillus y Gliocladium.*

Representa un 60% del peso de la celulosa, con la cual está íntimamente asociada. Las dificultades para su extracción y purificación son enormes por lo que los datos cuantitativos presentados en la bibliografía son aleatorios, se citan valores de 18-35% en bosques, 21-31% en pajas, 10-24% y hasta 35% del peso seco en mantillos forestales. Como se aprecia, importantes cantidades de esta sustancia fuertemente polimerizada e insoluble en agua, deben ser degradadas cada año.

Las **ligninas** no constituyen un grupo homogéneo de compuestos y su estructura varía con los vegetales y dentro de una especie, con su grado de madurez. Resisten la hidrólisis ácida, en agua caliente y solventes orgánicos, pero se **solubilizan en álcalis.**

El espectro de absorción en el ultravioleta (máxima absorción en la vecindad de los 280 nm) indica que la lignina es un derivado modificado del benceno y contiene sólo 3 elementos: **C, H y O.** La estructura básica es **aromática**, formada por polímeros de unidades de **fenilpropano (C_6-C_3)** (figura 8), con grupos alifáticos hidroxilos y carbonilos. Pertenecen a la misma familia de compuestos que ciertos pigmentos flavonoides y antocianos en **C_6-C_3-C_6** y de los aminoácidos fenilalanina y tirosina.

La biosíntesis de la lignina se realiza en tejidos jóvenes por hidrólisis de heterósidos aromáticos con liberación de agliconas, las que se transforman en radicales libres por acción de oxidasas, condensándose al azar para dar complejos tridimensionales muy ramificados, de peso molecular difícil de determinar, en general superior a los 10.000. Se han publicado numerosos modelos tendientes a explicar la complejidad de estos compuestos con unidades básicas de fenilpropano, con núcleos aromáticos, grupos metoxilo, puentes de oxígeno, ricos en C (67,5%), en grupos metoxilo (15-16% en coníferas y más de 25% en dicotiledóneas) y en -OH alcohólicos y fenólicos.

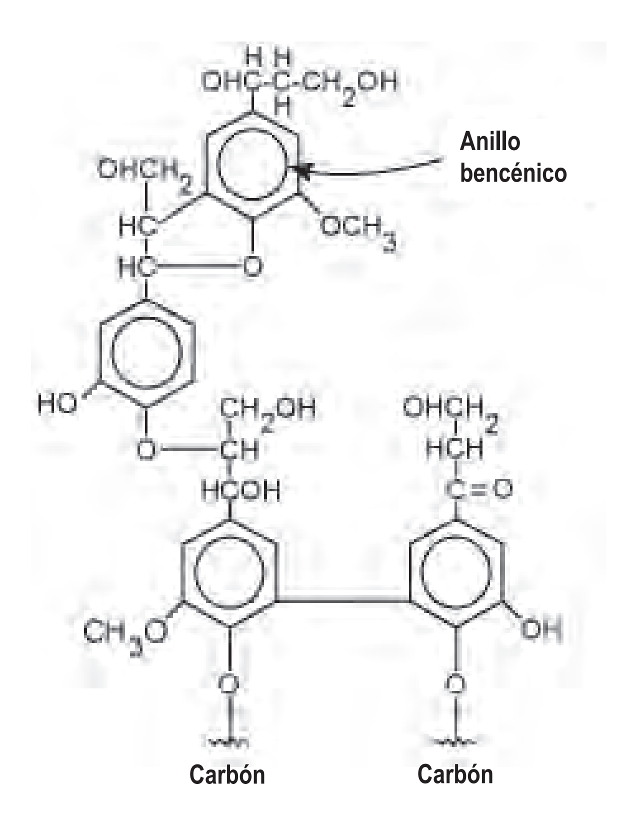


Figura 8- Esquema de la molécula de lignina

Se designa como:

- **protolignina** o lignina natural a los polímeros insolubles en agua formada por polimerización deshidrogenativa de alcoholes coniferil, cumaril o sinapil, iniciada por enzimas.
- **las ligninas industriales**, maderas modificadas química o físicamente, altamente polimerizadas. Difieren como sustratos de las naturales; poseen en general menor peso molecular, mayor solubilidad, con lo que aumenta su biodegradación: los lignosulfonatos se obtienen por tratamientos con soluciones ácidas de $NaHSO_3$, las álcali ligninas son el resultado de la extracción con soda y sulfuro de sodio, las fenol ligninas o etanol ligninas aluden al procedimiento de extracción, contienen una variedad de compuestos orgánicos (azúcares, polisacáridos, aldehidos, etc.) y pueden variar considerablemente en estructura física.

Los trabajos que estudian la degradación de la lignina emplean estos preparados, dada la imposibilidad de obtener la protolignina en estado inalterado (en solución acuosa y en autoclave a 100ºC se logró solubilizar sólo un 10% en 50 días).

- **los modelos de lignina,** compuestos aromáticos solubles en agua sintetizados a partir de derivados del alcohol cinamílico que poseen uniones intermonómeras presentes en la lignina natural.

Los residuos de industrias papeleras y de las que preparan pulpa para papel, las aguas servidas y los desechos resultantes de una ganadería extensiva, presentan serios problemas de polución por su alto contenido en lignina, lignocelulosa, celulosa, de lenta biodegradación.

Estos productos deben ser descompuestos antes de su deposición en gran escala en el ambiente: los ríos que reciben afluentes de la industria del papel se colorean intensamente y poseen grandes sedimentos de lignina (capítulo 21).

A diferencia de los otros biopolímeros, los estudios microbiológicos han avanzado poco por la complejidad de esta molécula: en efecto la lignina constituye el producto natural más **recalcitrante**, es decir escasamente biodegradable por su alto PM y estructura tridimensional aromática, que en algunos ambientes origina **lignitos y carbón**, las principales formas de materia orgánica fosilizada.

Es también importante precursor de las **moléculas húmicas:** al incorporarla a un sílico-gel nutritivo, la lignina se transforma espontáneamente por desecación en sustancias pardas, del tipo del humus.

La lignina es considerada por algunos ecólogos microbianos como un **plástico natural** ya que la polimerización de los precursores no está mediatizada por enzimas y el polímero posee muchos enlaces intermonómeros, que no son directamente hidrolizables por enzimas. Se le considera como un **producto de desecho** que la célula deja de eliminar y lo deposita en paredes secundarias y lámina media de plantas superiores, como **metabolito secundario** (no es esencial para el crecimiento, a pesar de beneficiar al organismo que lo posee). La lignina actuaría de un modo similar a las envolturas protectoras de la piel, de los vegetales y animales y quizá como las capas protectoras de las esporas.

Microflora ligninolítica

Entre los organismos estudiados, sólo los **microorganismos eucarióticos** mostraron capacidad para degradar completamente a la protolignina. La acción de los distintos organismos en el proceso son variados. Los métodos empleados para cuantificar la degradación incluyen estudios con especies aisladas sobre ligninas específicamente marcadas con C^{14} (en fracciones alquílicas, arílicas o en los grupos metoxilo) y análisis químico y estructural de **maderas** en decaimiento inoculadas y no inoculadas con especies fúngicas de interés. La degradación de la celulosa es cerca de tres veces superior a la de la lignina.

Por la dificultad en la preparación de medios selectivos, el aislamiento de especies responsables es muy dificultoso. Incluso, una disminución en la concentración del sustrato, no siempre es índice de degradación. La molécula puede ser adsorbida a micelios o células microbianas, e incluso la degradación puede enmascararse por la síntesis de sustancias del tipo de la lignina por numerosos hongos. Los estudios se realizan inoculando trozos de madera esterilizados.

Los organismos más activos son **los hongos** responsables de las **podredumbres de la madera: blanca, parda y blanda,** que han sido muy estudiadas por sus consecuencias en el deterioro de postes, vigas de madera. Son sobre todo *Basidiomycetes* y algunos *Ascomycetes*.

Los hongos de la **podredumbre blanca** son los más activos degradadores de la lignina, pudiendo convertir la madera en CO_2 y H_2O. Degradan lignina y otros polisacáridos, con pérdida de peso rápida: *Pleurotus ostreatus, Phanerochaete chrisosporium, Polyporus anceps.*

Los hongos de la **podredumbre parda** degradan extensivamente polisacáridos y causan modificaciones químicas limitadas de la lignina. Son incapaces de metabolizar anillos aromáticos y son más eficientes en la degradación de celulosa y hemicelulosas. Atacan cadenas laterales, dejando fenoles que se oxidan dando pigmentos marrones o pardos. Estudios con *Lenzites trabea* demostraron que la descomposición es sobre todo oxidativa y que la demetilación de unidades fenólicas y no fenólicas de la madera constituyen las principales reacciones degradativas. Otros hongos activos: *Poria cocos, Lentinus lepideus, Poria monticola.*

Los hongos de las **podredumbres blandas** degradan los principales componentes de la madera. El material se transforma en una masa oscura, desorganizada, con poca pérdida de peso y la ligmina sufre alteraciones parciales. Se comprobó con algunas especies, como *Preussia fleshhkii y Chaetomium piluliferum,* descomposición de anillos marcados (3% a CO_2 en 25 días) y demetoxilación significativa. Son sobretodo *Ascomycetes* y Hongos Imperfectos.

El moho *Fusarium solani* crece sobre ligninas sintéticas y las degrada. Es interesante examinar la capacidad de otros hongos para degradar ligninas naturales o industriales.

Entre los organismos **procarióticos,** algunas bacterias han sido referidas como ligninolíticas, sobre todo en cultivos mixtos, en el suelo. Especies de *Azotobacter* son capaces de degradar tanto los anillos como los grupos metoxilo cuando crecen con compuestos aromáticos solubles, aunque a velocidad menor que la actividad de poblaciones mixtas de bacterias.

Algunos actinomicetes poseen capacidad de degradar lignina, rompen enlaces ß-aril éter, presentes en ligninas naturales, pero se requieren mayores conocimientos sobre los mecanismos de degradación de estos organismos. Las bacterias atacan sobretodo las cadenas laterales alifáticas.

El rol que juegan los **animales** en la descomposición de la lignina no puede ser ignorado, aunque su principal actividad sea una disminución del peso molecular como consecuencia de destrucción mecánica. **Insectos, invertebrados y rumiantes** contribuyen a la despolimerización física de la lignina e incrementan la digestibilidad de la lignocelulosa, atacada por los microorganismos asociados a sus tractos gastrointestinales (anaerobiosis).

Sólo los microorganismos eucariotas son capaces de degradar completamente este polímero.

En resumen: son sobre todo los hongos imperfectos y los basidiomicetes, los organismos más activos en la degradación de ligninas naturales. Algunas bacterias, incluidos los actinomicetes demostraron habilidad para atacar ligninas sintéticas marcadas (cadenas laterales). Las **interacciones microbianas** estimulan frecuentemente la degradación y el proceso es realizado por poblaciones complejas.

Degradación

La mayoría de los estudios se realizaron con cultivos de hongos de la **podredumbre blanca**, por su reconocida habilidad de degradar completamente a este polímero. Los trabajos no son sencillos; se emplearon ligninas libres de otros compuestos carbonados, como madera molida, o ligninas sintéticas marcadas. En *Phanerochaete chrysosporium,* uno de los hongos mejor estudiados, se encontró que éste no crece con lignina sola y requiere un sustrato metabolizable, como celulosa o glucosa. Incluso en la naturaleza, la presencia de celulosa estimula la actividad ligninolítica de este hongo en mayor grado que el succinato o glicerol. *P. chrysosporium* prefiere pH ácidos: 4,0-4,5, temperaturas óptimas relativamente altas, las fuentes de nitrógeno pueden ser amonio, nitratos o aminoácidos, pero altas concentraciones en medio de cultivo inhiben la degradación de la lignina y se requieren altas presiones parciales de O_2.

La figura 9 presenta las relaciones entre el crecimiento, el agotamiento en las fuentes de nitrógeno y la actividad ligninolítica de *P. chrysosporium*. El sistema ligninolítico de este hongo es: i) constitutivo, ii) se expresa sólo en el metabolismo secundario, iii) es afectado por limitaciones en carbono, sulfato y nitrógeno, iv) es marcadamente afectado por la concentración de oxígeno, la degradación de la lignina fue 2-3 veces superior a 100% de O_2 que en el aire (21%), lo que corrobora la creencia de que la degradación es un proceso oxidativo.

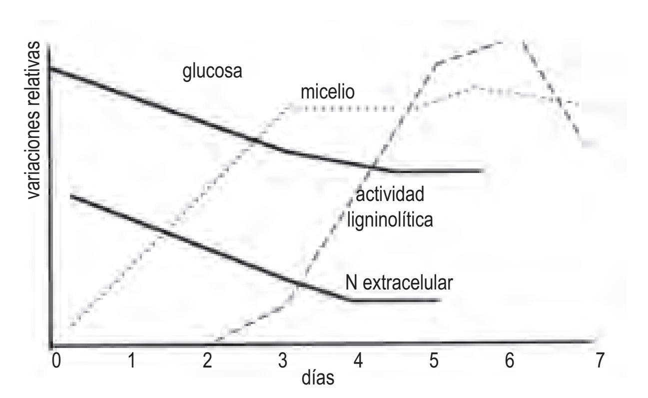


Figura 9- Agotamiento de nutrientes, crecimiento y degradación de la lignina por el hongo *Phanerochaete chrysosporium*

Como se observa, la lignina es descompuesta en la fase estacionaria (crecimiento nulo), en presencia de un co-sustrato, pero en ausencia de fuentes de nitrógeno (la adición de amonio retarda la aparición de la actividad ligninolítica).

El agotamiento de las fuentes de nitrógeno inicia un segundo metabolismo en el hongo asociado a la degradación de la lignina. Se entiende por **metabolismo primario** el que está directamente acoplado a actividades del crecimiento, mientras que los denominados **secundarios** (cometabolismo) están asociados a la sobrevivencia.

Se ejemplifica muy bien el rol de la actividad ligninolítica con una expresión que dice: **los hongos degradan lignina para alimentarse de la celulosa de la madera**. Se piensa que la degradación de la lignina brinda muy poca energía al microorganismo, suficiente para sobrevivir, pero no para crecer. Esto explica la ausencia de un mecanismo enzimático específico para la despolimerización de la lignina. Se piensa que también intervienen procesos degradativos de naturaleza química. El nivel de enzimas que participan es bajo y algunos autores comparan el proceso con una **erosión del polímero** mediatizada por enzimas:

- **oxigenasas**, que rompen anillos aromáticos, fenol oxidasas, incluyendo lacasas, tirosinasas y peroxidasas. La formación de radicales libres por acción de fenol oxidasas pueden ocasionar ruptura de enlaces entre anillos aromáticos y la cadena lateral con propano.
- **celobiosa**: **quinona oxidorreductasa**, activa en la degradación de celulosa y lignina por hongos de la podredumbre blanca.

No se conoce bien la naturaleza de las enzimas que son activas en los enlaces C-C y C=O, que contribuyen a la despolimerización.

Como resumen analizaremos la figura 10 donde se muestra las relaciones del complejo **lignocelulosa** en el ciclo del carbono. En efecto, la mayoría del carbono orgánico de la tierra está en forma de compuestos lignocelulósicos, sintetizados a partir del CO_2 y en productos de su degradación (humus, turba, lignitos y carbón), lentamente mineralizada en la naturaleza ya que la lignina, comparada a un material plástico, aunque de naturaleza biológica, actúa como efectiva barrera que impide la degradación de los otros componentes.

En ambientes aeróbicos, el polímero de lignina es erosionado biológicamente por enzimas microbianas no específicas a productos más simples y CO_2 o sufre una complexación con otros constituyentes para formar humus.

- **En ambientes anaeróbicos,** la lignina y el humus son productos difíciles de degradar (**recalcitrantes**), se acumulan y contribuyen a la formación de turbas, lignitos y carbón. La madera, producto de la fotosíntesis en bosques, posee tiempos de renovación tan largos como 35-45 años, ya que contiene un 25% en peso de lignina, que limita su biodegradación.

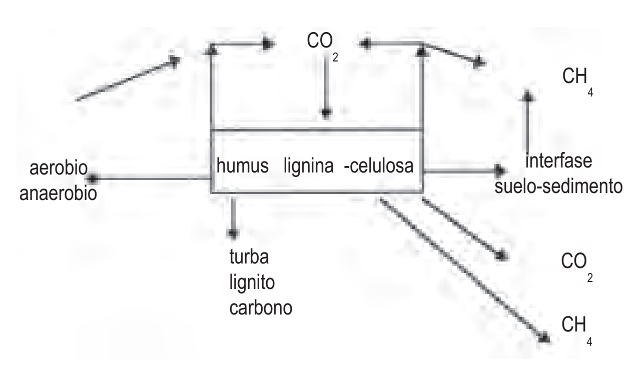


Figura 10- Complejo lignocelulósico y sus transformaciones

Los taninos

Son compuestos muy abundantes en ciertas plantas, sobre todo en las coníferas. Son moléculas de gran tamaño con múltiples funciones fenoles que les permiten formar complejos estables con proteínas, celulosa, etcétera.

Los taninos pueden ser:

- **solubles en agua**: poseen molécula glucídica con funciones alcohólicas esterificadas por ácido gálico o sus derivados; son hidrolizables química o enzimáticamente por tanasas
- **condensados**: son moléculas de alto peso molecular, insolubles en agua, algunos resisten la hidrólisis ácida y recuerdan a los flavonoides que se polimerizan para dar pigmentos pardos.

Un alto nivel de taninos en el suelo puede disminuir la degradación de moléculas orgánicas, sea por toxicidad directa sobre la microflora activa o por la inactivación de enzimas o formación de complejos resistentes con el sustrato.

Su degradación es obra sobre todo de los hongos y los mecanismos enzimáticos no han sido del todo dilucidados.

Constituyentes hidrófobos

Numerosas sustancias de carácter lipídico llegan al suelo con los restos vegetales y animales: **ceras, grasas, cutina**. En su conjunto se extraen con mezclas de alcohol-benceno, representan un escaso porcentaje de la materia seca de vegetales (1-2%) pero son más abundantes en ciertos microorganismos (10%).

Las grasas son ésteres complejos de ácidos grasos y glicerol, mientras que las ceras constituyen ésteres con alcoholes superiores. Aparecen rápidamente en el suelo los ácidos y alcoholes por acción de esterasas (**lipasas**) de una variedad de microorganismos, sobre todo bacterias. Los productos de la degradación son empleados como fuentes de nutrientes y energía por los microorganismos, pero muchos de los ácidos grasos son incorporados como lípidos de reserva (ácido poli β-OH-butítico).

Más información se posee en la degradación de los lípidos de la superficie vegetal, como la **cutina**, que es secretada a partir de células epidérmicas oxidándose por el O_2 atmosférico. Puede recubrirse con ceras. También puede formarse sobre la lámina media péctica o estar mezclada con la celulosa, protegiendo a esas sustancias de la biodegradación.

La composición química de la cutina no se conoce acertadamente, se sabe que la molécula contiene 16-18 ácidos grasos unidos por enlaces éster y puentes de O.

Se reconocen dos enzimas: la **cutin-esterasa** que ataca los ésteres y la **carboxicutina peroxidasa**, que rompe los puentes de oxígeno. Levaduras y hongos son activos degradadores en la filosfera, pero bacterias, incluídos los actinomicetes también participan.

Los hidrocarburos

La síntesis de sustancias hidrocarbonadas y su degradación en el suelo son etapas importantes del ciclo del carbono. Muchos pesticidas están formados por hidrocarburos modificados y de su biodegradación depende la duración de su acción biocida. Detergentes sintéticos poseen también esta estructura molecular.

La formación de metano (CH_4) en los suelos es frecuente en la descomposición anaerobia de rastrojos en donde se produce abundante cantidad de H_2 empleado por las metanobacterias como fuente de energía:

$$CO_2 + 4H_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O$$

Los ácidos orgánicos simples acumulados en estos ambientes anaeróbicos son empleados también por las metanobacterias. La biosíntesis de metano está limitada a un grupo especializado de bacterias anaerobias que habitan suelos inundados, pantanos, abonos en fermentación, sedimentos marinos y tracto intestinal de animales superiores. Son difíciles de aislar en cultivo puro y la producción de CH_4 es muy activa en poblaciones mixtas. *Methanobacterium*, *Methanosarcina y Methanococcus*, son los principales géneros encontrados en el suelo y actúan al final de una cadena trófica (capítulo 21).

Otro hidrocarburo simple encontrado en ecosistemas naturales es el **etileno**, liberado por numerosas especies de hongos, bacterias esporuladas y actinomicetes. A bajas concentraciones actúa como una fitohormona: produce elongación de raíces y desarrollo de raíces laterales.

Otros hidrocarburos volátiles: etano, propano, propileno, son formados en atmósferas anaerobias, a partir de miembros de la microflora del suelo. Los de mayor importancia son el metano y el etileno.

Hidrocarburos de alto peso molecular

Son formados por bacterias, algas y esporas fúngicas, o llegan a los ecosistemas naturales con el **petróleo, parafinas y sus derivados.** Los solventes de muchos pesticidas tienen estructura de hidrocarburos y llegan al suelo o aguas donde deben ser degradados.

Los compuestos de cadena alifática son atacados por una variada micropoblación muy extendida en los suelos: se informaron densidades de 10^5/g suelo cuando se emplea parafina como sustrato. La velocidad de la degradación está relacionada con la longitud de la cadena y al grado de ramificación de la molécula. Muchos microorganismos degradan hidrocarburos alifáticos pero no los pueden usar como fuentes de carbono. Este fenómeno conocido como **cometabolismo** implica que las células deben metabolizar una segunda fuente orgánica. Los productos de la descomposición del hidrocarburo, al no ser asimilados, quedan en el medio: alcoholes, aldehidos, ácidos grasos. El ácido acético se origina desde un extremo de la cadena por β-oxidación. Pueden acumularse también cetonas.

Los hidrocarburos aromáticos **benceno, tolueno, xileno** y sus derivados son atacados por numerosos microorganismos del suelo. La ausencia de toxicidad en un ambiente dado indica que los organismos heterótrofos están actuando como agentes desintoxicantes. La evolución del CO_2 o la consumición del O_2 verifica estos hechos en ensayos de laboratorio.

Una microflora más especializada descompone moléculas como **fenol, naftaleno, antraceno**, con 1, 2 y 3 anillos bencénicos. Son sobre todo bacterias típicas y actinomicetes. Los organismos filamentosos son importantes en la degradación de constituyentes aromáticos derivados del humus. El O_2 es fundamental en los procesos de apertura del anillo.

Las primeras etapas del metabolismo comprenden la remoción de cadenas laterales y la introducción de grupos -OH. Los grupos metilo se convierten en carboxilo antes de la apertura del anillo.

Biosólidos y restos animales

La aplicación residuos animales al suelo es de práctica frecuente y su degradación está asegurada por la actividad biológica del mismo, pero la acumulación de grandes cantidades de ellos puede generar problemas en relación a:

- exceso de nitrógeno y riesgo de contaminación de aguas superficiales y subterráneas con nitratos, sobrevivencia y transporte de patógenos microbianos
- excesiva cantidad de fósforo que acompaña a muchos abonos y biosólidos (restos industriales y municipales) con riesgo de eutrofización de aguas
- materiales tóxicos (metales pesados y sustancias xenobióticas) pueden inhibir la degradación de los restos carbonados.

Es necesario regular la incorporación al suelo de estos restos y/o aconsejar un compostaje previo (capítulo 21).

Humus

La materia orgánica fresca desaparece rápidamente en ambientes naturales. El siguiente esquema muestra las posibles vías metabólicas en el suelo (figura 11).

El **humus** está constituido por mezcla de sustancias amorfas, que es originado de la fitomasa parcialmente descompuesta y de la síntesis microbiana. Son moléculas elásticas, de carácter ácido, de alto peso molecular y naturaleza coloidal, de gran superficie interna y externa, originadas por la acción de procesos físico-químicos y biológicos a expensas de productos de la degradación de la materia orgánica.

Su lenta mineralización (1-2% al año) hace de estas sustancias el verdadero reservorio de nutrientes del suelo, liberándose lentamente los iones minerales aprovechables por los vegetales.

El contenido y calidad de estas sustancias está en relación directa con la fertilidad del suelo por sus propiedades y es inclusive empleado en formulaciones comerciales de los llamados "**bioestimulantes orgánicos**" (cuadro 14).

Caracterización de las sustancias húmicas

La naturaleza de estas sustancias varía con los suelos, el clima, la cubierta vegetal, las prácticas agrícolas. La extracción del humus sin provocar alteraciones resulta muy difícil. Algunos autores emplean solventes de alta densidad (bromoformo-benceno de densidad 2) para separar la materia orgánica poco transformada y más liviana, del humus y la fracción mineral, que decantan. Los compuestos húmicos se extraen con soluciones alcalinas, aunque se corre el riesgo de extraer también el humus libre que puede condensarse (neoformación). Otros solventes empleados incluyen oxalato de amonio, FNa, pirofosfato de sodio.

Por hidrólisis ácida se liberan aminoácidos, azúcares, aminoazúcares y una fracción permanece no hidrolizable, con núcleos parecidos a los de la lignina, sólo degradados por tratamientos muy drásticos como pirólisis ácida o alcalina, fusión alcalina, H_2O_2 en caliente, etc.

Los análisis elementales indican en promedio:

45-65% en carbono, 30-40% en oxígeno, gran abundancia de grupos metoxilo ($-OCH_3$), fenoles (-OH), carboxilo (-COOH), poco nitrógeno (para algunos autores se trataría de impurezas) y S, P, Fe, etc.

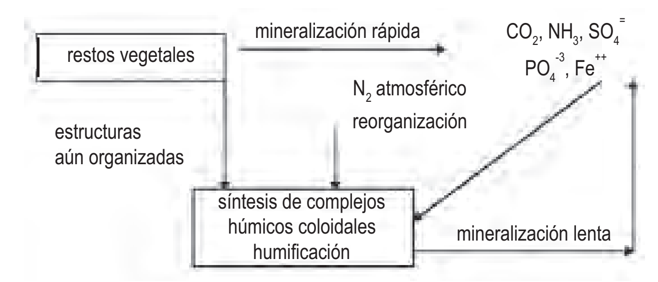


Figura 11- Degradación y humificación de restos vegetales

Esta composición elemental se parece a la de la turba, pero el origen y la actividad difieren mucho.

Cuadro 14- Principales efectos del humus en el suelo y las plantas

- mejora condiciones físicas, como agregación, aireación, retención de agua, intercambio calórico y permeabilidad del suelo
- aumenta la superficie específica, la CIC o el efecto tampón actúa como agente de complexación, quelación y retención de nutrientes y xenobióticos
- ejerce efectos fisiológicos, como permeabildiad de membranas, absorción de nutrientes, actividad enzimática y fotosíntesis
- ejerce acción protectora y actúa como fuente de nutrientes para los microorganismos
- actúa como reservorio de N, P, S, micronutrientes

Se distinguen varias fracciones:

- los ácidos fúlvicos que quedan dispersos o disueltos luego de acidificar el extracto alcalino con HCl o H_2SO_4
- los ácidos húmicos, extraíbles en álcali pero que precipitan a pH 2,5 y dan una fracción soluble en etanol
- los ácidos himatomelánicos

Los ácidos húmicos pardos están poco polimerizados y débilmente ligados a la fracción mineral, los ácidos húmicos grises son muy polimerizados y están ligados a los himatomelánicos.

- la humina residuo insoluble en ácidos y bases, materia orgánica muy evolucionada y difícil de separar de la materia orgánica fresca: una fracción es soluble en HCl 5N; el resto se une a arcillas, por lo que se requiere el empleo de HF para su extracción.

En las sustancias húmicas más condensadas predominarían los núcleos, con iso o heterociclos, como derivados del benceno, antraceno, furano, piridina, que pueden condensarse por puentes alifáticos, oxígeno, nitrógeno o por unión directa entre anillos. Estos enlaces le dan a la molécula gran estabilidad química y biológica.

El **nitrógeno** de las cadenas laterales representa un 30–35% del total, es fácilmente hidrolizable y es de origen proteíco, el resto de N del humus estaría condensado como pirrol, indol,etc. o bien formaría puentes entre bencenos y es más resistente a la degradación.

Precursores del humus y proceso de humificación

Varias hipótesis tratan de explicar los procesos que conducen a la formación de estas macromoléculas:

Las sustancias rápidamente degradables como la celulosa, hidratos de carbono simples, juegan un importante rol en la formación del humus. Luego de 7 días en el suelo, un 70-75% del C^{14} de la glucosa se localizó en fracciones húmicas, mientras que el C^{14} de acetato se distribuyó luego de 6-9 horas en la humina, ácidos fúlvicos y húmicos, en forma similar al carbono de la paja.

La lignina se reconoce como precursora del humus que se condensa con materiales proteícos de origen microbiano. Su participación ha sido señalada en numerosos trabajos: un 34% de la radioactividad de los ácidos húmicos se originó en la lignina, mientras que sólo un 6% lo hizo a partir de la celulosa.

El carbono de células microbianas contribuye a la fracción más simple del humus, los aminoácidos.

La figura 12 (Allison, 1973) presenta un esquema de formación de moléculas húmicas. En los últimos 50 años se han realizado numerosos estudios sobre la síntesis de la fracción orgánica del suelo. En el laboratorio una serie de reacciones condujeron a distintos tipos de humus artificial. Los microorganismos se consideran intermediarios en estos procesos; los restos de sus células y sus productos metabólicos constituyen etapas en una serie de reacciones. Los pigmentos microbianos como las **melaninas** son muy estables a la degradación, son parcialmente solubles en soda y se extraen en la fracción humus.

En el suelo los procesos son más lentos que en el laboratorio, pero las reacciones se aceleran por:

- la gran actividad superficial de las partículas (catálisis inorgánica)
- los sinergismos microbianos que posibilitan la formación de los mismos productos finales.

La **estabilidad** del humus es muy grande. En turbas congeladas de Alaska se estimó la edad de estas moléculas entre 1.775 +/- 110 y 11.005 +/-350 años (a 1 m de profundidad). A los 2 metros esta edad podría llegar a 25.300+/-300 años. En suelos templados esta edad es menor como consecuencia del mayor reciclamiento de la materia orgánica.

En resumen, se piensa que el humus es el producto de neosíntesis a partir de compuestos más o menos solubles originados en la descomposición de la materia orgánica fresca, mediante la combinación de procesos biológicos y físico-químicos, durante un largo período de tiempo.

La adición de materia orgánica al suelo puede provocar estimulación de la descomposición de la materia orgánica nativa. Este fenómeno se refiere como **efecto renovador** (*priming effect*) y fue observado luego del enriquecimiento del suelo con materia orgánica simple o restos vegetales.

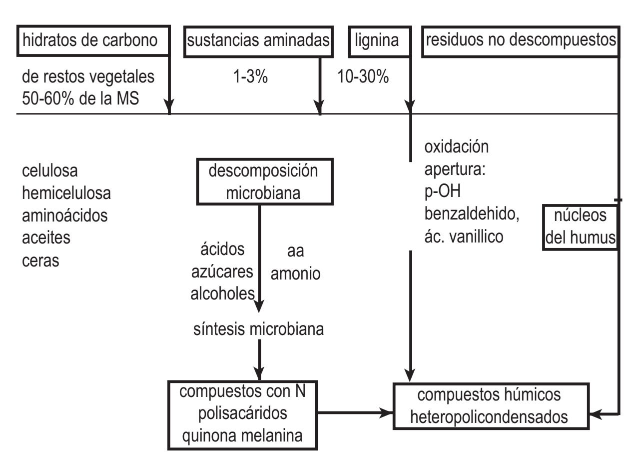


Figura 12- Esquema del proceso de humificación

Microbiología de la humificación

Los microorganismos participan en la formación de moléculas húmicas, catalizando distintas reacciones bioquímicas. Algunos autores discuten si su rol es directo o indirecto y una de las preguntas es cómo se concilia la rápida mineralización de las sustancias vegetales con su humificación.

Hipótesis:

- se postula la humificación de los restos que quedan en microporos donde no llegan las bacterias, pero sí sus enzimas, aunque no se puede olvidar la adsorción que pueden sufrir las enzimas en su camino hacia el sustrato.
- las moléculas son rápidamente policondensadas o polimerizadas a partir de radicales libres formados por la acción enzimática a altas concentraciones de sustancias monoméricas, cuando los organismos capaces de atacarlos están ausentes. Se puede seguir la humificación de hojas al microscopio.
- se sostiene que la humificación comienza en los restos inmediatamente luego de la muerte celular, cuando las enzimas autolíticas están activas, pero la destrucción aún no ha comenzado (condensación de aminoácidos de la hidrólisis proteíca con quinonas y polifenoles).

Las sustancias pardas aparecen en las células antes que los tejidos lignificados presenten alteraciones visibles. Cuando las células se descomponen, estas sustancias se liberan al suelo, pudiendo adsorberse a arcillas y protegerse del ataque microbiano.

Rol de los microorganismos

Se señala la importancia de los microorganismos y de la fauna en los distintos procesos que conducen a la humificación:

- mineralización de materiales originales,
- formación de subunidades estructurales y su
- posterior condensación.

Especies de *Penicillum, Aspergillus y Actimomyces* en medios con azúcares acumulan sustancias oscuras del tipo del humus, con péptidos y polifenoles. Los tipos más maduros se formarían a partir de estas moléculas por acción microbiana y procesos químicos y fisicoquímicos.

La condensación es estimulada por **oxidasas** producidas por microorganismos del suelo o aguas o del tracto digestivo de la fauna. La acumulación de pigmentos marrones oscuros es evidenciada en bacterias como *Pseudomonas sp.* en medio con extracto de levadura, glucosa y tirosina. Sustancias fenólicas y quinonas se transforman en polímeros tipo humus en las mismas células bacterianas por acción de **fenoloxidasas.** El espectro IR de las mismas es similar a los de los ácidos húmicos sintéticos y se fraccionaron en ácidos húmicos y fúlvicos.

Tanto la biosíntesis como la biodegradación de moléculas del tipo de las del humus ocurren simultáneamente por acción de una variada micropoblación que pone en juego un complejo y no bien identificado equipo enzimático.

Factores que afectan a la humificación

Entre los principales factores que afectan el proceso citaremos: vegetación, actividad biológica del suelo, clima, tipos de suelos, actividad del hombre.

La vegetación: aporta materias primas y es fuente de energía y nutrientes para los microorganismos. El cultivo afecta el microclima del suelo, la estructura por acción de las raíces y la atmósfera del suelo, por respiración de órganos subterráneos.

C/N de los restos: relaciones menores de 25/1 estimulan rápida mineralización, limitando el potencial de humificación, relaciones altas conducen a acumulación de humus libre.

La relación más favorable para la formación de humus estable parece ubicarse en la vecindad de 20/1 (los mantillos mejoradores, ricos en nitrógeno que se descomponen rápidamente).

Es necesario también tener en cuenta la relación entre los constituyentes lábiles y los estables, un predominio de compuestos solubles estimulan una rápida mineralización, y altos contenidos de lignina facilitan la humificación.

Los abonos verdes, ricos en nitrógeno y constituyentes solubles y pobres en lignina, son rápidamente metabolizados, enriqueciendo poco en carbono al suelo y activando la mineralización de la materia orgánica nativa. Los cultivos anuales enriquecen menos al suelo en carbono que los perennes. Un monocultivo de maíz posee menos poder de humificación al compararlo con gramíneas forrajeras.

Las pajas de cereales con alto contenido de lignina favorecen la humificación.

El clima influye en la productividad (cantidad y calidad del material vegetal) y directamente en la actividad biológica. La degradación del N del humus disminuye 2-3 veces por cada 10ºC de disminución de la temperatura. En regiones frías aumenta considerablemente el nivel de humus. El congelamiento y descongelamiento disminuyen la estabilidad de las moléculas húmicas. Por el contrario, un congelamiento prolongado aumenta la estabilidad. La desecación favorece la polimerización de sustancias prehúmicas (maduración). Suelos permanentemente húmedos presentan formas poco condensadas y móviles (ácidos fúlvicos).

Suelos: el contenido y calidad de las arcillas facilita la humificación. Un pH alto favorece la actividad mineralizante y la humificación por bacterias. El calcio facilita la floculación y maduración de las moléculas prehúmicas.

La humedad más favorable para la humificación se sitúa en la vecindad del 60% de la capacidad de campo. La saturación no favorece al proceso; los suelos saturados son pobres en humus. Un insuficiente drenaje conduce a humus bruto o a turba.

Ocurrirá máxima humificación cuando los procesos aerobios y anaerobios estén correctamente balanceados. Si la anaerobiosis es permanente, la humificación es prácticamente nula y se conduce a la formación de turbas. El proceso parece tener el óptimo en **microaerofilia o en condiciones de alternancia de períodos de aerobiosis y anaerobiosis.**

Actividad del hombre: el laboreo disminuye el nivel de materia orgánica al romper los agregados y exponer la materia orgánica a la biodegradación, pero el efecto de mezclado favorece la calidad. Alternancias de cultivo y barbecho favorecen la humificación. Los suelos cultivados presentan un humus más evolucionado, pero menos abundante, que puede descender por debajo de niveles críticos. Enterrar restos vegetales activa su mineralización y una aplicación más profunda favorece la humificación (condiciones micraerofílicas).

Deshumificación

Se encuentran gran número de dificultades en la investigación de biodegradación del humus: los microorganismos pueden crecer con ácidos húmicos pero emplean solamente los compuestos asociados, como los aminoácidos, dejando la estructura aromática intacta, hecho que sumado a la falta de datos sobre la estructura exacta de la molécula (si es que tienen una estructura básica común), tornan las comparaciones muy difíciles.

Además, las zonas claras alrededor de las colonias desarrolladas en medios con ácidos húmicos no indican necesariamente la degradación de los mismos; muchas veces, ellos son precipitados alrededor de las células.

A pesar de estos inconvenientes parece correcto afirmar que ciertos hongos, sobre todo *Ascomycetes y Basidiomycetes,* pueden degradar ácidos húmicos en el laboratorio por reducción enzimática de grupos aromáticos carboxilo a aldehido y luego hasta alcoholes. Los sistemas enzimáticos son **adaptativos**. En filtrados de cultivos de hongos creciendo sobre ácidos húmicos se detectaron alcohol salicílico y salicilaldehido.

Las técnicas respirométricas son muy útiles en el estudio de la mineralización del humus.

Se cuenta con poca información sobre la descomposición de los ácidos húmicos en la naturaleza. Intervienen poblaciones complejas con especies que atacan sustancias aromáticas, reuniendo en su conjunto al equipo enzimático necesario para degradar a las sustancias húmicas.

Las bacterias son activas sobre todo atacando las cadenas laterales alifáticas. Los actinomicetes pueden además degradar moléculas aromáticas provocando decoloración del medio.

Los hongos son activos degradadores de moléculas húmicas. Entre los productos de la degradación de los ácidos húmicos se han detectado residuos de la degradación de la lignina bastante como ácidos vaníllico y siríngico. En suelos donde la lignina está ausente, como los antárticos cubiertos de helechos, no se encontraron estos productos. Otras sustancias que aparecen en la degradación, como flavonoides, pueden derivar de síntesis microbiana o de la vegetación.

Ecología

Carbono: fuentes de carbono fácilmente degradables (0,5-2%) estimulan el crecimiento microbiano favoreciendo la degradación del humus en el laboratorio. Para otras especies la celulosa es más eficiente. El efecto sobre la humificación es el mismo que analizamos en la degradación de otros biopolímeros: el aumento microbiano provoca agotamiento de nutrientes y la población induce el equipo enzimático para degradar moléculas más complejas.

Nitrógeno: el de las cadenas laterales es asimilado por los microorganismos aunque en menor grado que las formas inorgánicas u orgánicas simples del suelo. Otras fuentes nitrogenadas ejercen efecto variable según las especies.

Calcio: los humatos cálcicos son más fácilmente degradados *in vitro* que los de sodio (efecto tampón favorable para la actividad enzimática).

Arcillas: ejercen efecto protector: la oxidación de los ácidos húmicos es más lenta con illita y montmorillonita. El aluminio refuerza el efecto estableciendo enlaces más estrechos entre los coloides orgánicos y minerales.

La tasa anual de descomposición de la materia orgánica es del orden de 1,8% en suelos pesados y de 2,2% en livianos.

Modelos de simulación

Un importante objetivo en estudios de biodegración es la organización de datos experimentales en modelos de simulación a partir de los cuales se pueden efectuar predicciones en relación a los ciclos de los nutrientes (C, N, P, S), al almacenamiento de materia orgánica y al impacto de prácticas de manejo de residuos en la calidad del ambiente y en la productividad del suelo. Un paso importante es la ubicación de la materia orgánica y de sus nutrientes en compartimentos o *pools*, con distintos tiempos de reciclamiento o tiempos de residencia media (TRM) (Stevenson y Cole, 1999).

La materia orgánica ha sido fraccionada en:

- **lábil**, o activa que se degrada en pocas semanas o meses, formada por mantillos, fracción liviana, la biomasa microbiana, fauna muerta y sus residuos y sustancias no húmicas unidas a minerales. Se usa como fuente rápida de nutrientes para el desarrollo vegetal y la actividad microbiana y es muy importante para mantener la productividad del suelo bajo agricultura sustentable (manejo de los residuos, mínimo laboreo y escasa fertilización). Esta fracción está relacionada al aporte de restos y es afectada por los factores que inciden en la actividad microbiana.
- **estable,** resistente a la descomposición y que persiste en el suelo por pocos años o aun décadas o más tiempo. Está integrada por el humus, funciona como reservorio de nutrientes y es importante en el balance a largo plazo del carbono en el suelo.

Muchos modelos se han elaborado a partir de 5 compartimientos que incluyen: la biomasa microbiana, dos formas de materia orgánica estabilizada (en forma física o química) y el componente de residuos vegetales, dividido en

dos reservorios: rápidamente degradable y resistente. Ejemplo de estas predicciones en los TRM:

- material vegetal descomponible, vida media 0,16 años
- biomasa microbiana, vida media 1,69 años
- material vegetal resistente, vida media 2,31 años
- MO estabilizada físicamente, vida media 49-50 años
- MO estabilizada químicamente, vida media 1.980 años

Una aproximación similar ha sido empleada para simular la dinámica de la materia orgánica en pasturas naturales y en suelos tropicales, con sub-modelos para transformaciones del N, P y S.

Las limitaciones señaladas a estos modelos incluyen:

- los componentes lábiles están en estado de continuo cambio y su medida en un momento dado provee de un índice relativo de disponibilidad de nutrientes bajo un conjunto de condiciones
- no todas las fracciones *(pools)* pueden medirse experimentalmente
- en condiciones de inmovilización neta, la biomasa funciona como reservorio de nutrientes en detrimento de la nutrición vegetal
- el concento de reservorios y de modelos basados en ellos no coincidirán con la realidad física, química y biológica

Sin embargo, los avances logrados en métodos computacionales y en las técnicas analíticas para la determinación de diferentes fracciones de la materia orgánica, hacen que estos modelos se vuelvan herramientas prácticas que economizan tiempo y numerosos experimentos de laboratorio y campo.

En resumen: aumentar y/o mantener el nivel de materia orgánica de un suelo es un objetivo prioritario en todo manejo agrícola. La aplicación de abonos orgánicos (restos de cosechas, subproductos industriales) contribuye a evitar la pérdida de humus en suelos sometidos a intensa explotación.

Los principales factores a tener en cuenta para elevar el contenido de materia orgánica de los suelos son: cantidad de materia orgánica aplicada, tipo de abono orgánico empleado, duración de la experiencia.

A modo de resumen se presentan las figuras 13 y 14. La figura 13 muestra las tasas de descomposición de diferentes materiales orgánicos en el suelo y en la figura 14 se esquematiza la cinética de esta degradación. Se verifica que la fracción activa del residuo, representada principalmente por azúcares, proteínas, amidas y celulosa es descompuesta en menos de un año, en tanto que otras fracciones resisten la degradación.

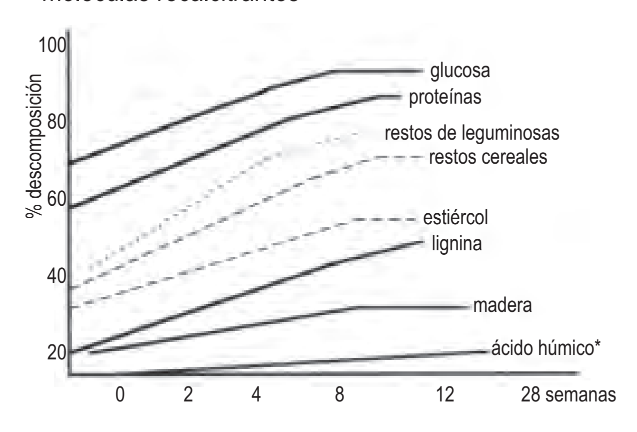


Figura 13- Velocidad de degradación de restos orgánicos en el suelo

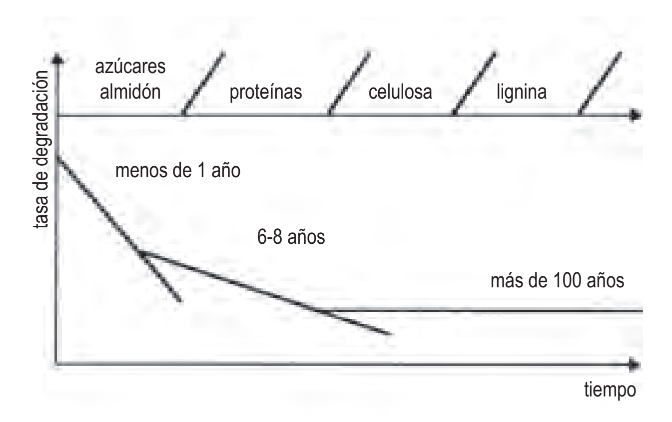


Figura 14- Cinética de la degradación de restos vegetales en el suelo

Bibliografía

Allison, F. E. **Soil organic matter and its role in crop production**. 1973, Elsevier Science Publishing, New York.

Dommergues, Y., Mangenot, F. **Ecologie microbienne du sols**., 1970, Masson & Cie. París.

Frenchel, T., King, G. M. & Blackburn, T. H. **Bacterial Biogeochemistry. The Ecophysiology of Mineral Cycling**, 1998, Academic Press, New York.

Frioni, L. **Procesos microbianos**. 1999, Fundación de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.

Stevenson, F. J. 1994 **Humus chemistry: Genesis, composition, reactions**. 2nd. Ed. John Wiley and Sons, New York.

Stevenson, F. J. & M. A. Cole **Cycles of Soils: carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur, micronutrients**, 1999, Wiley & Sons, New York.

Sylvia, D. M., J. J. Fuhrmann, P. G. Hartel, D. A. Zuberer **Principles and Applications of Soil Microbiology**, 1998, Prentice Hall, New jersey.

Preguntas de repaso

1) Defina la primera etapa del ciclo del carbono, la que asegura la síntesis de materia orgánica y los microorganismos que participan.
2) ¿Por qué el CO_2 y el CH_4 producen efecto invernadero?
3) Describa algún método de evaluar la actividad mineralizante de un suelo.
4) ¿Cuáles son los principales constituyentes de los residuos vegetales y cómo difieren en la facilidad de degradación por la microflora del suelo?
5) ¿Cómo distingue esta degradación de la del humus?
6) Explique la aplicación de dos métodos para evaluar la degradación de un compuesto orgánico en el suelo.
7) ¿Qué vías pueden seguir los hidrocarburos aromáticos en el suelo?
8) Formación y consumo de metano. Consecuencias para el ambiente
9) Concepto de humificación: como se determina la contribución de sustancias precursoras?
10) Por qué resulta difícil estudiar la degradación del humus?
11) Analice el efecto de la incorporación al suelo de: i) abonos verdes y ii) pajas de cereales.

10 Ciclo biológico del nitrógeno

De los nutrientes fundamentales para el desarrollo vegetal, el nitrógeno constituye uno de los elementos sobre cuyas transformaciones en el suelo se han realizado más investigaciones en los últimos años. Se presenta frecuentemente como limitante del crecimiento vegetal ya que es removido en cantidades superiores al resto de los nutrientes y además su nivel en los suelos es generalmente bajo. Se emplea en la síntesis proteica, de ácidos nucleicos, aminoazúcares y de otras moléculas de importancia en la célula. Favorece el crecimiento vegetativo, el tamaño de los granos y su porcentaje de proteínas; aumenta la absorción del fósforo y potasio.

La importancia del nitrógeno se reconoce en:

- **la agricultura,** incrementando los rendimientos, modificando la composición química y calidad de los vegetales
- **el ambiente:** los problemas ambientales asociados a excesos de compuestos nitrogenados son muy conocidos. Las principales fuentes de contaminación de aguas y suelos son las prácticas agrícolas y las provenientes de la atmósfera. La industria vierte aguas con elevada concentración de óxidos de N o amoníaco que contamina los cursos de agua. Se puede llegar a la eutrificación (alta concentración de sales, incluidas las nitrogenadas) de las mismas y a la contaminación de fuentes de agua potable con nitratos, muy tóxicos.

Las transformaciones del nitrógeno en la naturaleza se aprecian en la figura 1 y en el cuadro 1 se presentan las reservas de nitrógeno en el planeta.

Formas de nitrógeno en el suelo

En la capa arable se encuentran valores entre 0,02 a 0,4%, y más de 2% en suelos muy orgánicos. En suelos minerales en clima templado con 2-3% de materia orgánica en el horizonte 0-20 cm y 0,12-0,15% de nitrógeno, los valores de 2000-3000 kgN/ha aseguran las necesidades de los vegetales por muchos años.

Sin embargo el agregado de 100 kgNO_3^-/ha, que corresponde a menos del 1% del N de la capa arable, puede favorecer el desarrollo vegetal. Este fenómeno se atribuye al hecho de que la mayor parte del nitrógeno no puede ser asimilado directamente por los vegetales. Gran proporción del humus es resistente al ataque microbiano y solamente una pequeña fracción del N orgánico (1-3%) se mineraliza cada año.

La estabilidad del nitrógeno del suelo se explica por la formación de compuestos con constituyentes orgánicos (taninos, fenoles, lignina) o por adsorción a arcillas.

La mayor proporción del nitrógeno del suelo es **orgánica** (98% del total) y menos del 2% son formas minerales, N_2, N_2O, NO, amonio, nitritos y nitratos, de muchas de las cuales depende la nutrición vegetal. Esta pequeña fracción resulta muy importante porque es empleada como nutriente, intermediarios metabólicos, donadores o aceptores de electrones o son productos finales de muchas transformaciones de este elemento.

La fracción orgánica

- 20-40% se reconoce como aminoácidos
- 5-10% como aminoazúcares
- las bases púricas y pirimídicas no exceden al 1%

vegetales

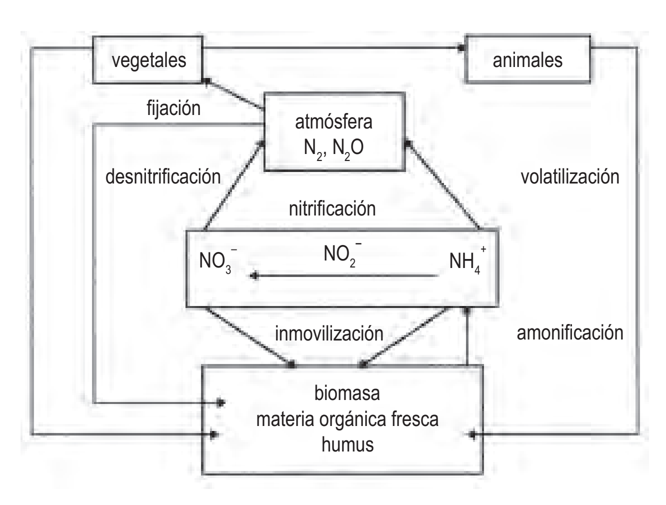


Figura 1- Ciclo biológico del nitrógeno

La naturaleza del resto del nitrógeno es difícil de determinar, integra los heterociclos de las moléculas húmicas, lentamente degradables. Es probable que el N-aminoácidos provenga de peptidoglicanos y ácidos teicoicos, constituyentes de paredes bacterianas y sólo se detectan trazas en los suelos, pues son rápidamente biodegradados. En la fracción de los **ácidos húmicos**, un 20-50% del N está constituido por aminoácidos, un 3-10% de aminoazúcares y una pequeña cantidad de bases derivadas de ADN y ARN bacteriano, sobre todo. En la fracción fúlvica, un 20-30% es N-aminoácido y 8-10% son aminoazúcares.

La **fuente primaria** de nitrógeno para el suelo la constituye la **atmósfera**, en donde el N_2 representa un 79%. En el cuadro 1 se observa que la mayor reserva de nitrógeno la constituyen las rocas primarias (98% de todo el N_2), le sigue la atmósfera, luego las rocas sedimentarias, los sedimentos marinos y el reservorio más pequeño lo constituye el suelo (sobre cada hectárea de suelo se acumulan 80.000 ton de N_2), de la litósfera (37 kg/cm^2) y de las rocas sedimentarias (872 kg/cm^2).

Como se observa, existe una gran masa de nitrógeno atrapado en las rocas como N_2 no directamente aprovechable por los vegetales. El cuadro 2 cuantifica procesos que involucran a compuestos con nitrógeno y la figura 2 (Fenchel *et al*, 1998) muestra los cambios en el estado de oxido-reducción de este elemento, que pasa de -3 en el amoníaco y en la materia orgánica, 0 en el N_2 hasta + 5 en los nitratos (cambio neto de 8 electrones). Como se aprecia el amonio puede ser convertido en un gran número de productos.

Cuadro 1- Reservas de nitrógeno en el ecosistema terrestre

rocas primarias	40-190 x 10^{15} ton N_2 (97,8%)
atmósfera	3,9 x 10^{15} ton N_2 (2%)
rocas sedimentarias	0,8-4 x 10^{14} ton N_2 (0,2%)
mar	22 x 10^{12} ton N_2 5,4 x 10^{11} ton N_2 en sedimentos 6,5 x 10^{11} ton N-NO_3^-
suelo	5,5 x 10 ton N en restos vegetales y animales 11 x 10^9 ton de N en vegetales 1 x 10^9 ton de N inorgánico soluble

Cuadro 2- Procesos biológicos y abiológicos que involucran al N

Naturaleza del proceso	**Denominación**	**Estimación cuantitativa**
biológico	fijación del N_2 asimilación inmovilización mineralización desnitrificación	175 x 10^6 ton N_2/año
físico-químico	fijación industrial lavado sedimentación solubilización volatilización precipitación	30-35 x 10^6 ton N/año 15 x 10^6 ton N/año 15 x 10^6 ton N/año 5 x 10^6 ton N/año 5 x 10^6 ton N/año 60 x 10^6 ton N-NO_3^-/año

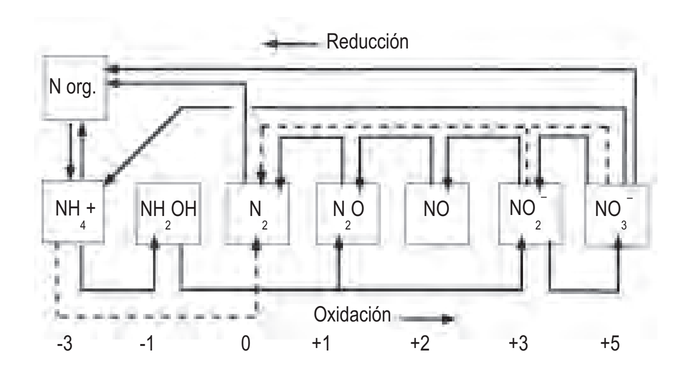


Figura 2- Ciclo del nitrógeno: procesos de oxidación y reducción. Las líneas punteadas indican que N_2 puede producirse por otras reacciones además de la clásica desnitrificación

Entradas de N a los ecosistemas

1. De naturaleza biológica: constituye la fijación biológica del nitrógeno (FBN), realizada por protistas inferiores dotados de un complejo equipo enzimático, **la nitrogenasa**, capaz de reducir los triples enlaces de la molécula del N_2 a amonio, el que luego es incorporado en cetoácidos para formar aminoácidos y luego proteínas.

La ecuación global no refleja los mecanismos involucrados y los intermediarios entre el N_2 y las formas orgánicas en las células: los aminoácidos, ureídos, etc.

Fijación biológica del nitrógeno (FBN)

$$N_2 \xrightarrow[N_2asa]{8e^- \ 8H^+} 2\ NH_4^+ + H_2$$

NH_4^+ → aminoácidos

Los **requisitos** para que el proceso ocurra se resumen:

- **nitrogenasa:** enzima responsable de la reducción
- **energía**: en forma de ATP que el organismo debe generar a partir de moléculas orgánicas (heterótrofos) o de la luz (fototrofos). En asociaciones simbióticas el hospedante fotosintético brinda la energía y demás requisitos
- **minerales**: la enzima posee Mo, Fe, se requiere también Mg para el complejo Mg-ATP
- **poder reductor**: los electrones que salen del sustrato y pasan por los distintos componentes de la N_2asa para reducir el triple enlace del N_2 por pasos de 2 electrones por vez
- **esqueletos carbonados**: requeridos para fijar el NH_3 que no se detectó libre ya que rápidamente pasa a aminoácidos o ureídos. También brindan la energía y poder reductor.

El proceso es patrimonio de algunas bacterias, que fijan en vida libre o se asocian con raíces, tallos, hojas, en combinaciones simbióticas o en asociaciones rizosféricas y filosféricas.

2. De naturaleza no biológica: las aguas de lluvia aportan nitrógeno combinado como amonio, nitrito, sustancias albuminoides, que provienen del suelo o aguas, de la contaminación en zonas industriales o de la fijación no biológica por radiaciones o reacciones fotoquímicas.

El hombre ha logrado la reducción del N_2 (**proceso Haber-Bosch)**

Fijación industrial del nitrógeno (FI)

$$N_2 + 3H_2 \longrightarrow 2NH_3$$

catálisis inorgánica, 200-300 atm, 1000ºC

Este proceso se realiza a altas temperaturas y presiones en plantas industriales muy sofisticadas que pueden producir unas 1000 toneladas de N por día. Pero resulta un proceso oneroso para los países sin reservas petroleras o de gas. El H_2 proviene de reservas de gas natural, del petróleo o del metano, que se agotan rápidamente.

Salidas de N del ecosistema

La desnitrificación es una de las causas más importantes de pérdida de nitrógeno por vía biológica y consiste en una respiración anaerobia de sustratos orgánicos o inorgánicos, con nitrato como aceptor de electrones en la cadena respiratoria. El producto final gaseoso, N_2, N_2O, se pierde a la atmósfera. El amonio también se puede volatilizar en condiciones de pH y temperaturas altas.

En resumen: este elemento sufre numerosas transformaciones de origen biológico: mineralización-inmovilización, óxido-reducción, fijación-volatilización. No se encuentran las etapas de solubilización-precipitación ya que la mayoría de los compuestos nitrogenados minerales son solu-

bles en agua. El hombre incide en estas transformaciones por el manejo que realiza de los ecosistemas, por la tecnología de depuración de efluentes altamente contaminados y en el caso de suelos, por la aplicación de fertilizantes y sustancias biocidas, la inoculación de microorganismos fijadores de N_2.

Mineralización-inmovilización

Las formas inorgánicas minerales amonio, nitrito y nitrato se producen continuamente en el suelo por procesos de mineralización y son la fuentes de nutrientes para los vegetales –amonio y nitratos–, los nitritos resultan tóxicos. La mayor parte es soluble en agua y son desplazados con ésta a horizontes no alcanzados por las raíces. La fracción más retenida es el amonio que puede estar adsorbido en forma intercambiable en el complejo arcilla-humus o fijado dentro de las hojuelas de las arcillas y puede representar una importante fracción en horizontes inferiores y hasta 3,5-8% del N total en la capa arable.

La determinación de estos iones posee un valor relativo ya que son múltiples las vías que pueden seguir en el suelo:

- volatilización del NH_3
- desnitrificación de los nitratos
- asimilación por vegetales
- inmovilización en células microbianas
- fijación a coloides (amonio)
- lavado, erosión, quemado

Sólo las mediciones periódicas pueden proveer información sobre la dinámica de las formas del nitrógeno en ecosistemas naturales.

La mineralización del nitrógeno orgánico comprende dos etapas:

- **amonificación** que libera NH_3 a partir de moléculas orgánicas
- **nitrificación**, proceso por el cual se liberan nitritos o nitratos, iones solubles en agua a partir de combinaciones minerales u orgánicas.

La amonificación es realizada por un gran número de microorganismos heterótrofos y animales del suelo que atacan distintas moléculas orgánicas: urea, aminoácidos, proteínas, aminoazúcares, ácidos nucleícos, sustancias húmicas. La nitrificación es la producción biológica de nitritos o nitratos a partir de amonio o de combinaciones orgánicas.

La inmovilización es el proceso simultáneo e inverso a la mineralización, por la cual las formas minerales: amonio, nitrito o nitrato entran a formar parte de combinaciones orgánicas en el citoplasma microbiano (ciclo interno de los elementos).

Amonificación

Sustrato: es muy variado, cualquier tipo de molécula orgánica nitrogenada.

Microflora: está integrada por innumerables especies de bacterias, incluidos los actinomicetes, hongos, protozoos, algas, que poseen numerosas enzimas tanto extracelulares como: proteinasas, peptidasas, quitinasas, lisozima, ARNasa, etc. o intracelulares (asparaginasa, glutaminasa, aminoácido deshidrogenasas).

Ambiente: como consecuencia de la falta de especificidad en los sustratos, la amonificación es uno de los procesos menos sensibles a los cambios del ambiente y se realiza tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, bajo un rango de pH compatible con actividad biológica, en regiones frías, como en el rango termófilo.

Cmineralizado/Nmineralizado: en ecosistemas en equilibrio, la relación C-CO_2/Nmineral es aproximadamente 10/1. Con aportes de sustancias orgánicas, esta relación se altera de acuerdo a la relación C/N de las mismas: una relación alta provocará más liberación de CO_2, si el N% de los restos vegetales es alto, la proporción de amonio y nitrato será mayor.

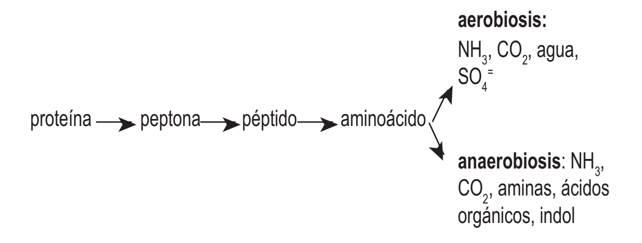
Amonio: se considera un producto de **desecho** celular. Una vez satisfecha la demanda microbiológica por el nitrógeno, el resto metabolizado es eliminado como NH_3.

Energía: la desaminación no provee de energía al microorganismo, pero la misma puede obtenerse del catabolismo del esqueleto carbonado de la molécula: proteína, ácidos húmicos, etc.

Evaluación: La evolución del amonio en suelos y aguas, enriquecidos o no con sustancias orgánicas nitrogenadas, se determina en el campo o en el laboratorio. Como el amonio puede seguir distintas vías en la naturaleza lo que evaluamos es la **amonificación neta**, o sea la diferencia entre el amonio producido y el que siguió otras vías en el suelo. El empleo de compuestos con N^{15} permite evaluar **amonificación real.**

Amonificación de aminoácidos y proteínas

Las proteínas constituyen un buen sustrato para la microflora, a la que brindan la mayoría de los elementos para la síntesis de macromoléculas: C, H, O, N, S. Son atacadas por enzimas extracelulares según el siguiente esquema.



Los **aminoácidos** son degradados rápidamente en suelos y aguas. Se encuentran libres en pequeña proporción, producto de la actividad microbiana sobre proteínas, o son excretados por las raíces. La actividad es mayor en capas superficiales, en las más profundas la adsorción a coloides puede ser importante y la nitrificación menor.

Amonificación de ácidos nucléicos

Numerosos microorganismos del suelo poseen enzimas extracelulares capaces de degradar ácidos nucleicos, ADNasa y ARNasa, provenientes de células vegetales, animales y microbianas con liberación de los mononucleótidos, que son fácilmente atacadas por la microflora.

ARN, ADN → mononucleótido → (Pi ↑) → purinas pirimidinas + azúcar → NH_3, aa; urea

Se liberan fosfatos por acción de fosfatasas vegetales o microbianas. Las bases púricas o pirimídicas y el azúcar resultante son empleados por una variada microflora apareciendo en el medio amonio, aminoácidos, ácidos orgánicos, urea, dependiendo de las condiciones y de los organismos dominantes. Acidos orgánicos y alcoholes acompañan a aminas, amidas, CO_2 y agua, en anaerobiosis.

Otros sustratos: urea, cianamida y fertilizantes de amonificación progresiva

La urea se encuentra frecuentemente en los ecosistemas naturales (fertilizantes, excreciones de animales o de la hidrólisis de los ácidos nucleicos). Su degradación es muy rápida y la microflora ureolítica es muy numerosa: comprende aerobios y anaerobios facultativos, cocos y bacilos que soportan pH elevados resultantes de la liberación de amoníaco:

$$\begin{matrix} NH_2 & & NH_2 & & \\ | & & | & & \\ C{=}O + H_2O & \rightarrow & COO & \rightarrow & 2NH_3 + CO_2 \\ | & & | & & \\ NH_2 & & NH_4 & & \end{matrix}$$

La cianamida cálcica es otro fertilizante empleado comúnmente. Por hidrólisis no biológica se forma urea, la que es mineralizada por la población ureolítica:

$$CaCN_2 + 2H_2O \rightarrow H_2CN_2 + Ca(OH)_2$$
$$+ H_2O \rightarrow CO(NH_2)_2 \xrightarrow{\text{ureasa}} 2NH_3 + CO_2$$

A los efectos de retardar esta hidrólisis y permitir que los cultivos dispongan del nitrógeno a medida que lo requieren, se emplean complejos a base de urea; la urea-formaldehido es uno de ellos, la oxamida, otro:

$$(HC = N - \underset{\underset{O}{\|}}{C} - N = CH -)\,n \qquad H_2N - \underset{\underset{O}{\|}}{C} - \underset{\underset{O}{\|}}{C} - NH_2$$

urea-formaldehido — oxamida

La aplicación de estos fertilizantes, así como el empleo de inhibidores de la nitrificación, posibilitan la toma gradual de amonio por los cultivos, evitando su rápida oxida-

ción a nitratos, muy móviles en suelos donde el régimen hídrico es intenso. El amonio es adsorbido en forma intercambiable en el complejo coloidal del suelo, disminuyendo su lixiviación y resultan fertilizantes más seguros que los nítricos.

Ecología

Como hemos visto este es un proceso muy poco específico, realizado por gran número de microorganismos heterótrofos adaptados a las más variadas condiciones ecológicas.

La amonificación ocurre en todas aquellas condiciones compatibles con la vida (que aseguran que el agua se encuentre en estado líquido).

Temperatura: como con todas las reacciones biológicas, una elevación de temperatura estimula el proceso. El óptimo del amplio grupo de amonificantes se ubica en el rango **termófilo**.

pH: puede llevarse a cabo desde pH muy bajos (3,5-4,0) a superiores a 9,0. Una fuerte acidez retarda el proceso y son sobre todo las bacterias anaerobias y los hongos los activos en esas condiciones. A pH superiores dominan los actinomicetes y algunas algas que pueden emplear fuentes de nitrógeno orgánicas.

Cultivos vegetales: ejercen un doble efecto, por un lado proveen restos orgánicos nitrogenados por descamación de raíces, exudados, percolados a través de las hojas y follaje, estimulan la amonificación real o bruta, pero también absorbe a los iones amonio: la amonificación neta se ve así inhibida.

En resumen: el proceso se realiza en amplias condiciones ambientales, con innumerables sustratos y la microflora responsable incluye prácticamente a todos los microorganismos heterótros. La actividad sería máxima en aerobiosis, temperaturas en el rango termófilo, neutrofilia y humedades medias

Estabilidad de compuestos nitrogenados orgánicos

Numerosos investigadores han remarcado la estabilidad de la fracción nitrogenada orgánica del suelo. En efecto, en una estación de crecimiento se mineraliza entre 1 y 5% del N total; pero al agregar al suelo una proteína, aminoazúcar u otras formas de nitrógeno orgánico, éstas desaparecen muy rápidamente. Diversas hipótesis tratan de explicar esta estabilidad (Dommergues, Mangenot, 1970).

- **Formación de complejos entre proteínas y fracciones orgánicas** del suelo, como lignina, compuestos fenólicos o sustancias del tipo del humus
- **Complexación con minerales arcillosos:** la adsorción externa al complejo de intercambio del suelo (más firmemente si en la proteína dominan las cargas electropositivas) o la inclusión dentro de las hojuelas, posibilitan un retardo en la biodegradación. Esta hipótesis explica también la inhibición de enzimas extracelulares
- **Toxicidad del ambiente:** la vegetación o el metabolismo microbiano producen sustancias inhibidoras cuya concentración aumenta con la concentración hidrogeniónica del medio y la anaerobiosis: cumarinas, taninos, resinas, contribuyen a estabilizar la materia orgánica en suelos forestales

La liberación se realiza gradualmente a medida que la vegetación las requiere, evitando pérdidas importantes por lavado o desnitrificación. Pero en algunos ecosistemas este bloqueo puede ser negativo para la nutrición de las plantas, como ocurre en horizontes superficiales (A_o) de formaciones forestales.

Nitrificación

La nitrificación se define como la conversión biológica del nitrógeno desde un estado reducido (NH_4^+, N-orgánico) a otro más oxidado (NO_2^-, NO_3^-), a partir de compuestos orgánicos o inorgánicos, por una microflora auto y heterótrofa.

Es un proceso biológico conocido desde hace mucho tiempo que se realiza en el suelo, en ambientes marinos, abonos, y en los procesos de depuración de aguas servidas. Ya en la época napoleónica se producía el nitro de Chile en pilas de suelo, con abonos orgánicos y carbonato de calcio. Pasteur postuló la naturaleza microbiana del proceso y hacia 1890 Winogradsky aisló a los microorganis-

mos responsables. Confirmó la naturaleza biológica calentando una columna de suelo o tratándola con cloroformo: el proceso cesaba y los nitratos volvían a formarse al reinocular este sistema con suspensión de suelo fértil.

La nitrificación afecta a:

- **Los cultivos**, ya que constituye un proceso fundamental para la nutrición vegetal, los nitratos son fácilmente absorbidos, en menor grado el amonio y los nitritos resultan tóxicos.
- **Al ambiente,** pues una intensa nitrificación resulta muchas veces perjudicial para el hombre. Los iones nitrito y nitrato son solubles y por lo tanto móviles con el agua que puede llevarlos lejos de la zona de absorción radical. El amonio, al ser fijado en el complejo de intercambio, resulta menos móvil. La polución de las aguas por los nitratos resulta un problema en los países que emplean grandes dosis de fertilizantes. Los nitratos se reducen a nitritos en la sangre, uniéndose a la hemoglobina que se convierte en metahemoglobina, molécula que no funciona en la transferencia del O_2. La enfermedad es conocida como **metahemoglobinemia** (enfermedad de los chicos azules). Los estándares para consumo humano son inferiores a 10 mg/L de N-NO_3^- para el agua potable.

Nitrificación autótrofa

La nitrificación autótrofa puede dividirse en dos pasos, cada uno realizado por un grupo particular de organismos:

I) Nitritación: $NH_4^+ + 1{,}5\ O_2 \longrightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O$ **ΔG = 84 cal/mol**
II) Nitratación: $NO_2^- + 0{,}5\ O_2 \longrightarrow NO_3^-$ **ΔG = 17, 8 cal/mol**

Son procesos metabólicos generadores de energía (ATP): **respiraciones aerobias con sustratos inorgánicos** (amonio y/o nitrito). Los microorganismos son **quimiolitoautótrofos** que aprovechan la energía y las coenzimas reducidas en la cadena respiratoria para sus necesidades plásticas, sobre todo para reducir el CO_2 a material celular.

Por los rendimientos energéticos se aprecia que se puede originar cuatro veces más biomasa por la oxidación de la misma cantidad de N cuando ésta es realizada por el grupo I. En la naturaleza, en general, las densidades para ambos grupos no difieren tanto.

Nitrificantes autótrofos

Son bacterias muy relacionadas pertenecientes a la familia *Nitrobacteriaceae*, gram negativas, que no forman esporas, bacilos, cocos o espirilos, en general móviles por flagelos polares.

Autótrofos obligados, muchos compuestos orgánicos les resultan tóxicos, por alteraciones producidas en la esterilización en autoclave. Fuentes de **carbono:** del CO_2, bicarbonatos y carbonatos y de **energía**: de la oxidación de sales amoniacales o nitrosas.

El cuadro 3 resume las características de los 4 géneros de bacterias oxidantes de amonio y de los 3 oxidantes del nitrito. Las **especies más representativas** son *Nitrosomonas europea y Nitrobacter winogradsky*. Los nitrificantes autotróficos secundarios, es decir, el resto de los que figuran en el cuadro 3 aparecen en general en bajo número y presentan rangos más estrechos de temperatura y pH para su desarrollo. Otra importante diferencia la constituye la habilidad para crecer heterotróficamente de algunas especies del segundo grupo. *Nitrobacter agilis* puede crecer con materia orgánica y es estimulado por extracto de levadura. *Nitrobacter winogradsky* posee mayor potencial para crecer heterotróficamente que *Nitrococcus y Nitrospina*. Piruvato y aminoácidos estimulan el crecimiento de *Nitrosomonas europea*.

Velocidad de crecimiento: comparada con la de la mayoría de las bacterias heterotróficas, la $\mathbf{v_c}$ de las bacterias nitrificantes es baja. Tiempos de generación de 8 horas han sido informados en medio de cultivo. Se piensa que en la naturaleza se sobrepasan las 20-40 horas. El desarrollo en medio de cultivo se acelera con sales de bicarbonato solubles o de álcali para contrarrestar la caída del pH. El rendimiento celular es también bajo (0,15 kg biomasa/kg N-NH_4^+ oxidado para la nitritación y de 0,02kg de biomasa/kg N-NO_2^- oxidado para la nitratación).

Eficiencias bioquímicas (N inorgánico oxidado/C-CO_2 asimilado) de 14-70/1 para *Nitrosomonas* y de 76-135/1 para *Nitrobacter* (gran capacidad sintética, la mayoría no requieren factores de crecimiento). Como vimos, los oxidantes del amonio obtienen más energía de la reacción y deben metabolizar menos nitrógeno por unidad de carbono asimilado.

Cuadro 3- Bacterias nitrificantes autótrofas

Género	Morfología	(G+C)	Crecimiento	Habitat
Oxidantes del amonio				
Nitrosomonas	Bacilos rectos, 1-2 flagelos, o inmóviles	47,4 - 51	5 - 40º	aguas frescas
Nitrosospira	Espirilos, flagelos perotricos o inmóviles	54,1	25 - 30ºC	suelo
Nitrosococcus	Cocos en pares o tétradas, móviles con 1 flagelo o peritricos o inmóviles	56,5 - 51	2 - 30ºC pH 6,0 - 8,2	suelo
Oxidantes del nitrito				
Nitrobacter	Bacilos cortos, móviles con flagelo polar o inmóviles	60,7 - 61,7	5 - 40ºC pH 5,7-10.2	suelo, mar, aguas frescas
Nitrospira	Bacilos largos, inmóviles	57,7	20 - 30ºC	mar
Nitrococcus	Cocos con citomembranas muy ramificadas	57,7	20 - 30ºC pH 7-8	mar

Aislamiento: resulta difícil y es frecuente la presencia de contaminantes muy relacionados morfológicamente como *Pseudomonas, Hyphomicrobium, Mycobactrium, Flavobacterium*. Su lento crecimiento dificulta la eliminación de estos contaminantes.

El aislamiento puede realizarse en forma:

- **Directa**: por agotamiento en cajas de Petri con sílicogel nutritivo: solución salina, sales de amonio o nitritos, carbonato de calcio. Las microcolonias se detectan por el halo transparente por disolución del carbonato por los ácidos producidos.
- **Por enriquecimiento** previo en el mismo medio selectivo líquido y varios pasajes en el mismo medio fresco, que facilita el aislamiento en medio sólido.

La actividad es estimulada por burbujeo o agitación de los cultivos líquidos ya que son aerobios estrictos. El pH óptimo es ligeramente alcalino, pero pueden tolerar rangos más amplios de pH en el suelo. Son mesófilos, la temperatura óptima se sitúa entre los 24 a 30ºC.

Mecanismo de la nitrificación autótrofa

La oxidación del amonio a nitrato implica la transferencia de 8 electrones (-3 a + 5). La conversión de amonio a nitrito ocurre en por lo menos dos pasos:

$$NH_4^+ + 0{,}5\ O_2 \longrightarrow NH_2OH + H^+ \qquad \Delta G = -0{,}7\ \text{kcal/mol}$$
$$NH_2OH + O_2 \longrightarrow NO_2^- + H_2O + H^+ \qquad \Delta G = -83{,}3\ \text{kcal/mol}$$

Como se observa, la disminución de la energía libre en la oxidación del amonio es pequeña comparada con la de oxidación de la hidroxilamina. El proceso se estudió en células intactas y en extractos libres de células. Se aisló una oxidasa de la hidroxilamina relacionada al **citocromo c.** Se sugiere que la hidroxilamina es convertida en un intermediario que se descompone espontáneamente en óxido nitroso, no oxidado por *N. europea.*

En la nitratación participa una nitrito oxidasa, inhibida por cianuro e involucra el sistema citocromos:

$$\text{cit c } Fe^{+3} + NO_2^- \rightarrow \text{cit c } Fe^{+2} + \rightarrow \text{“}NO_2\text{” (radical libre) cit } a_1\ Fe^{+2} + \text{“}NO_2\text{”} +$$
$$NO_2^- + 0{,}5\ O_2 \rightarrow \text{cit } a_1\ Fe^{+3} + NO_3^-$$
$$\text{globalmente: } NO_2^- \rightarrow \text{cit c} \rightarrow \text{cit } a_1 \rightarrow O_2$$

El poder reductor (NADH) se genera en estas bacterias por transporte inverso de electrones en la cadena respiratoria, con consumo de ATP ya que el potencial redox de los pares amonio-nitrito y nitrito-nitrato no son suficientemente negativos para reducir el NAD^+ (capítulo 3).

Nitrificación heterótrofa

Los nitrificantes heterótrofos constituyen un grupo menos especializado que requieren medios con sustratos orgánicos con amonio o nitritos y pueden acumular nitritos o nitratos cuando el crecimiento cesó. Los organismos son bacterias, incluidos los actinomicetes, y hongos. *Aspergillus flavus* es reconocido en la oxidación del amonio hasta nitrato, a partir de nitropropionato con un equipo enzimático especializado, con nitrito intermediario:

$$\text{3 nitropropionato} \xrightarrow{\text{peroxidasa}} NO_2^- + CO_2 + H_2O$$

Energía: su principal fuente proviene de sustratos orgánicos pero la energía liberada es escasa y no satisface los requerimientos plásticos de los microorganismos (no está acoplada a procesos de biosíntesis).

Sustratos: pueden ser **amonio, nitrofenoles, oximas, amidas, hidroxilamina, nitropropionato**. Algunos de ellos tienen carácter de **factores de crecimiento**, sobre todo los ácidos hidroxámicos, involucrados en la toma de hierro, por formación de quelatos (**sideróforos**). Otro grupo tiene carácter **biocida** como la actidiona, ácido aspergílico (lucha biológica) y otros poseen carácter mutagénico como nitrito, hidroxilamina y derivados nitrosos (Myrold, 1998).

El cuadro 4 resume datos sobre la nitrificación heterótrofa, comparándola con la autótrofa. Como se aprecia, la velocidad del proceso autótrofo es 10^3-10^4 veces mayor que el heterótrofo y la capacidad de formación de productos finales es del orden de 10^2 a 10^3 veces superior.

El rol de los nitrificantes heterótrofos en la provisión de nitratos para los vegetales es controvertido. Si bien su eficiencia es baja, su densidad puede ser alta en ciertas condiciones, acumulándose cantidades importantes de nitrógeno mineral (suelos de bosque). Pueden además, actuar cuando los autótrofos no pueden sobrevivir: altas temperaturas, bajo nivel de O_2, pH ácidos.

Cuadro 4- Nitrificación autótrofa y heterótrofa

Organismo	**sustrato**	**producto final**	**velocidad** µgN/día/g biomasa	**concentración** µgN/mL
Arthrobacter spp	NH_4^+ succinato	hidroxilamina,	12	0,2
		nitrito	375	
		nitrato	250	
	NH_4^+ y N-orgánico	nitrito	-	1,6
		nitrato	-	14,1
	NH_4^+ y acetato	hidroxilamina	4.500	15,0
		nitrito	9.000	18,0
		nitrato	660	2,0
		ác. hidroxámico	600	6,0
		1-nitroetanol	300	10,0
Pseudomonas aeroginosa	acetaldoxina	nitrito	2.000	150,0
Hansenula marakii	nitroetano nitropropano	nitrito	1.680	2,8
Aspergillus flavus		ác. 3 nitropropiónico	1.400	45,0
	NH_4^+ y sacarosa	nitrato	1.350	75.0
Nitrosomonas spp	NH_4^+	nitrito	$1,3 \times 10^6$	$2-4 \times 10^3$
Nitrobacter	NO_2-	nitrato	$5,7 \times 10^6$	$2-4 \times 10^3$

Ecología

Se analizarán aspectos ecológicos de la nitrificación autótrofa por su importancia cuantitativa y por el hecho de estar más afectada por las condiciones del medio. La gran similitud fisiológica de las especies actuantes explica en parte la sensibilidad a condiciones del ambiente: el proceso puede no ocurrir o ser extremadamente lento en suelos anegados, de pH muy bajo, o bajo temperaturas muy altas. Como la amonificación es un proceso menos específico, en el suelo se acumulará **amonio**.

Analizaremos el efecto de los principales factores:
Nivel de nutrientes: el sustrato energético puede ser el factor limitante: amonio o nitrito. *Nitrosomonas* generalmente oxida 35 unidades de nitrógeno y *Nitrobacter* unas 100 unidades de nitrógeno por cada C-CO_2 asimilado. La producción de nitratos es proporcional al amonio disponible. El carbono no es una limitante ya que lo toman del CO_2, carbonatos, bicarbonatos. El nitrito puede acumularse cuando se inhibe la actividad de los oxidantes del nitrito, como ocurre luego de aplicar altas dosis de urea, amoníaco anhidro o sales de amonio, a pH alto. La autoecología de estos grupos nos explica ya esta inhibición (cuadro 5).

Se observa que el primer paso de la oxidación es más versátil. Condiciones adversas de pH, temperatura o dosis altas de fertilizantes amoniacales, conducen a la acumulación de nitritos, tóxicos para los vegetales y la mayoría de los microorganismos.

Cuadro 5- Autoecología de *Nitrosomonas y Nitrobacter*

	pH	Temperatura	N- amoniacal
Nitrosomonas	tolera pH altos y bajos	aun activo a bajas temperatura	tolera altas dosis
Nitrobacter	inhibido a pH:	inactivo	inhibido a altas dosis
	superiores a 9,0	sobre 40º e	
	inferiores a 5,0	inferior a 5ºC	

Muchos suelos fijan grandes cantidades de amonio en los coloides. El potasio, catión que también es fijado, interfiere en la nitrificación del amonio atrapado entre las hojuelas de las arcillas. A medida que se incrementa el nivel de potasio agregado, disminuye la nitrificación del amonio fijado. Los nutrientes que afectan a la amonificación, como el nivel y calidad de la materia orgánica, afectan indirectamente a la nitrificación.

pH: existe alta correlación entre la nitrificación y el pH del suelo. En medios ácidos, la nitrificación está inhibida o es muy lenta (debajo de pH 6,0). Mientras que el pH óptimo de *Nitrosomonas* se ubica en el rango de 7 a 9 y aún más alcalino, para *Nitrobacter* se sitúa en la neutralidad o ligeramente alcalino. La nitrificación a bajos pH se explica por:

- cepas adaptadas a pH ácidos
- el proceso se realiza en microhabitats donde el pH es neutro a diferencia del resto del suelo.

La población nitrificante autótrofa es mayor en suelos neutros o ligeramente alcalinos y el encalado favorece el proceso en suelos ácidos, que presentan una gran fase de latencia (varios días) en la aparición de los nitratos (ejemplo de la incidencia favorable del hombre sobre un proceso microbiano).

La figura 3 esquematiza resultados de la percolación cíclica de distintas sustancias a través de una columna de suelo.

- **un aminoácido,** que presenta una fase de latencia en la aparición de los nitratos requerida para la amonificación previa
- la nitrificación de **sales amoniacales** presenta un período de corta latencia correspondiente a su oxidación a nitrito
- **los nitritos** son inmediatamente oxidados

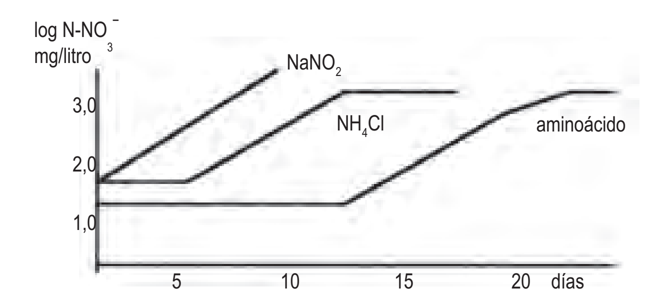


Figura 3- Nitrificación de varios sustratos

Oxígeno: es un requerimiento obligado en el proceso. La estructura del suelo tiene gran efecto: la nitrificación es inversamente proporcional al tamaño de los agregados.

Humedad: es otro de los factores que afectan profundamente a la nitrificación autótrofa ya que regula el nivel de oxigenación del suelo. La formación de nitratos cesa cuando el nivel de humedad es inferior al punto de marchitamiento permanente, mientras que la amonificación es aún activa. La figura 4 presenta la nitrificación en suelo franco limoso con 500 mg/kg de N-NH_4^+ como fosfato diamónico y sometido a diversas tensiones de succión desde 0 (saturado) hasta 15 barias e incubado a 21ºC. En general, se podría aceptar la siguiente escala de tensiones de humedad para una máxima acumulación de nitrato:

0,1 > 0,33 > 1 > 5 > 15 > 50 > 0 barias

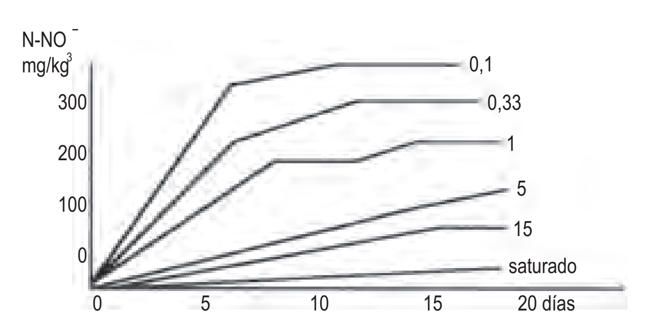


Figura 4- Nitrificación a diferentes tensiones de humedad (barias)

Temperatura: la temperatura óptima tanto en el suelo como en medios de cultivo se ubica entre **28 y 36ºC**, aunque pueden aparecer nitratos por encima de 40ºC por acción de cepas adaptadas. Varios autores determinaron que aún a temperaturas tan bajas como 2ºC la nitrificación puede alcanzar valores considerables si el amonio y la densidad de microorganismos nitrificantes no son limitantes.

Efecto rizosférico: la atmósfera en la vecindad de las raíces es más pobre en O_2 y más rica en CO_2 que la atmósfera sobre el suelo, debido a la actividad respiratoria de la mayoría de los heterótrofos. La nitrificación, por lo tanto, será menor. Se cita también la inhibición de algunos cultivos sobre este proceso, sobre todo de los bosques de coníferas, ricos en sustancias fenólicas. La intensa inmovilización de formas minerales del nitrógeno por microorganismos heterótrofos explica también la disminución de nitratos en rizosferas. Se evitan así pérdidas por lavado o desnitrificación de los nitratos formados, en ambientes de baja tensión de O_2.

Estación del año: el efecto de la estación está condicionado por la interacción de numerosos factores como la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, la humedad, la aireación, etc. No puede predecirse en que épocas del año el nivel de nitratos será mayor. En general, en la región templada la producción de nitratos es más activa en primavera y otoño, más lenta en verano e invierno. Pero las fluctuaciones de temperatura y humedad y las prácticas culturales pueden alterar este comportamiento.

En resumen: la nitrificación autótrofa es rápida en suelos húmedos y aireados, bien drenados y de buena estructura, lenta en suelos pesados. El óptimo de humedad varía considerablemente con los suelos, se citan óptimos entre 1/2 y 2/3 de la capacidad de campo (cuadro 6).

Cuadro 6- Factores que afectan a la nitrificación en suelos

- **Contenido de agua:** la estimula hasta un 60% de CC, luego se limita
- **La fertilización** con amonio o abonos orgánicos la favorecen (alto nivel de NH_4)
- **Humedad y temperatura:** suelos húmedos y fríos limitan el proceso y las pérdidas de N se pueden limitar fertilizando en otoño
- **Población nitrificante**: para oxidar 1 mg N/kg suelo/día se necesitan 300.000 organismos. Suelos con bajo N pueden contener 1.10^4 nitrificantes/g.
- **El pH**: favorable en el entorno del neutro (microambientes)

El rehumedecimiento de suelos secos estimula la nitrificación. Se explica este hecho por la acción de enzimas liberadas por células muertas en la desecación, que permanecerían adsorbidas a la fracción organo-mineral del suelo que se sumarían a las presentes en las células vivas. La temperatura favorece el proceso.

Inhibidores de la nitrificación

Para disminuir pérdidas de nitrógeno por lavado o desnitrificación en suelos sin cubierta vegetal importante o que sufre frecuentes períodos de anegamiento, se han desarrollado investigaciones tendientes a inhibir la nitrificación.

Es sabido que:

- **los herbicidas e insecticidas** empleados en dosis normales no afectan al proceso
- **los fungicidas y fumigantes** ejercen gran acción como inhibidores de la nitrificación, aun en dosis normales
- **otras sustancias** son empleadas como el 2 Cl 6 (tri Cl metil) piridina, conocido comercialmente como **N-serve**; 2-amino-4 Cl-6 metilpiridina (**AM**); dicianodiamida; tiourea; 2-sulfanilamidotiazol (**ST)**; los tiazoles; triazinas; isocianatos, etc. El N-serve es uno de los más frecuentemente empleados que inhibe a los autótrofos pero no a los nitrificantes heterótrofos y se usa mucho en áreas arroceras sometidas a alternancias de secado e inundación.

El inhibidor es degradado con el tiempo y la nitrificación recomienza, con el activo desarrollo del vegetal. El éxito del método está vinculado a la velocidad a la que la microflora degrada al inhibidor.

Ciclo interno del nitrógeno (mineralización-inmovilización). Biomasa microbiana

El nitrógeno mineral es asimilado por los microorganismos y pasa a formar parte de combinaciones orgánicas en las células. Como deja de estar por un tiempo disponible para los vegetales, se dice que ha sido **inmovilizado.** Este bloqueo del N mineral es transitorio, ya que las moléculas orgánicas son liberadas al ecosistema por procesos de excreción o a la muerte celular, donde son rápidamente mineralizadas.

La **biomasa microbiana** producida representa una inmovilización temporaria de energía, carbono y elementos minerales, los que van siendo gradualmente liberados para los vegetales.

A las transformaciones cíclicas de mineralización-inmovilización que ocurren simultáneamente se les agrupa en el llamado **ciclo interno del nitrógeno**, ya que ocurren en el interior de los microorganismos, mientras que las transformaciones que ocurren con la participación de los vegetales, la atmósfera, etc. se agrupan en el **ciclo externo o ciclo biogeoquímico**. La figura 5 presenta un esquema de las transformaciones de los nutrientes en ecosistemas terrestres.

- **Mineralización bruta o real:** es la cantidad total de nitrógeno mineral producido. Se puede evaluar también la amonificación y/o nitrificación bruta. Estos iones no constituyen productos finales estables y pueden seguir múltiples vías en el suelo (cuadro 7) y resulta difícil evaluar estos procesos si no se emplean elementos marcados (N^{15}).
- **Mineralización neta:** se evalúan las cantidades presentes en el ecosistema en el momento del análisis que resultan de la diferencia entre lo producido (mineralización bruta) y aquellos procesos que se detallan en el cuadro 7. Globalmente, se puede representar el N mineral evaluado como:

$$N \text{ mineral evaluado} = N \text{ total producido} - (Ni + Na + Nv + Nd + Nl + \ldots)$$

donde: Ni = inmovilizado; a = lavado; v = volatilizado; f = fijado; d= denitrificado; l = lavado

El N mineral disponible para los vegetales en un momento dado depende de la magnitud relativa de procesos simultáneos y opuestos: la **mineralización y la inmovilización.** La competencia entre vegetales y microorganismos por el N mineral es importante cuando éstos disponen de abundante sustrato energético. La mayor parte es entonces incorporado al ciclo interno (**biomasa**) ya que los microorganismos son activos competidores de las plantas.

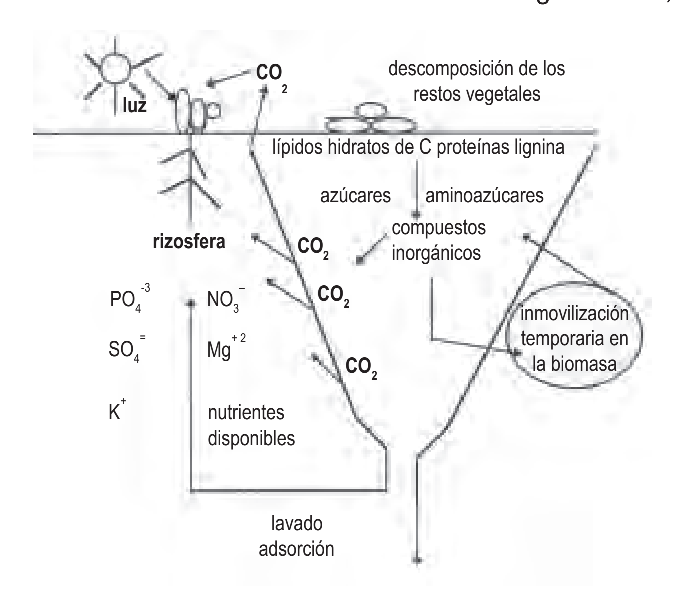


Figura 5- Descomposición de restos vegetales y ciclo interno de los nutrientes en suelo agrícola

Cuadro 7- Procesos biológicos y abiológicos con N mineral

NH_4^+	NO_2^-	NO_3^-
nitrificación(NO_2^-,NO_3^-)	nitratación(NO_3^-)	desnitrificación (N_2)
inmovilización(N-org)	idem	idem
asimilación(N-org)	idem	idem
adsorción a coloides	lavado	lavado
fijación a coloides	reducción(N_2)	idem (NO_2^-, NH_4^+)
lavado, menos	lavado	lavado
erosión	idem	idem
volatilización	-	-

Agregado de restos vegetales

Pajas de cereales

Analizaremos los procesos que ocurren cuando se incorpora al suelo un resto vegetal con bajo nivel de N%, por ejemplo una **paja de cereal** (C = 40% y N = 0,5%). La relación C/N es alta, 80/1 y la microflora del suelo degrada este resto con el objeto de obtener subunidades para sus macromoléculas y energía. La velocidad de degradación y los productos finales dependerán de las condiciones del suelo, clima, dosis, forma de aplicación (en superficie, enterrado, picado, molido).

Como el nitrógeno está en baja proporción, los microorganismos inmovilizarán el amonio y nitrato surgidos de la mineralización, que conjuntamente con formas minerales de S, P, Fe, etc. integrarán las moléculas de las nuevas células.

Por algún tiempo no se detectará N mineral en el suelo ya que la demanda biológica excede al aporte (domina la **inmovilización neta)**. Con la fracción carbonada la situación es diferente, pues ocurren pérdidas gaseosas como CO_2, CH_4, a partir de respiraciones, fermentaciones, decarboxilaciones.

La figura 6 presenta la evolución de la relación C/N en residuos pobres en N% a medida que se van degradando. La C/N disminuye y llega asintóticamente a valores del orden de las de la microflora dominante y del humus de ese ambiente (10-15/ 1).

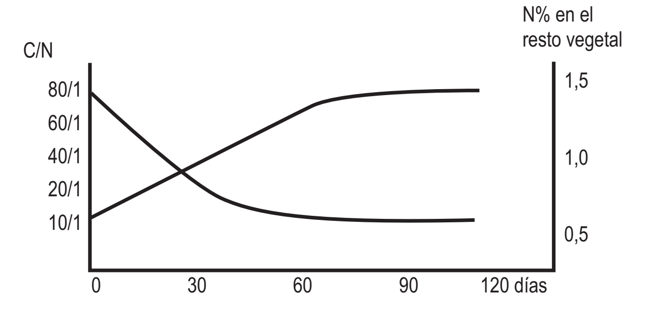


Figura 6- Cambios en la relación C/N y en el N% durante la descomposición de paja de cebada

El N% de los restos (vegetal y microbiano) aumenta a medida que la degradación procede, ya que no existen pérdidas importantes de este elemento que se mineraliza y pasa inmediatamente a moléculas orgánicas en las células de la población que hizo eclosión con el agregado del sustrato orgánico.

- **Relación C/N de equilibrio o crítica**, la degradación de las fracciones carbonadas y nitrogenadas proceden paralelamente, la demanda iguala a la oferta y en el medio aparecen iones amonio y nitrato. Se citan relaciones críticas de **20-25/1,** es decir, más altas que las relaciones C/N frecuentes de los suelos.
- **Relaciones más altas que la crítica** favorecen la inmovilización neta.
- **Relaciones más bajas** favorecen la mineralización neta.

La naturaleza química de las fracciones carbonadas y nitrogenadas puede hacer variar esta relación. Así, restos ricos en lignina, difícilmente degradables, pueden considerarse con relaciones críticas superiores.

En el cuadro 8 se muestra la relación C/N típica de algunos materiales orgánicos (Stevenson y Cole, 1999).

Cuadro 8- C/N de materiales orgánicos

Material	C/N
Biomasa microbiana	6 - 12
Aguas residuales	5 - 14
Humus	10 - 12
Abonos animales	9 - 25
Residuos de leguminosas y abonos verdes	13 - 25
Residuos de cereales y pajas	60 - 80
Residuos de bosques (madera)	150 - 500
composts	15 - 20

En el cuadro 9 se efectúa un cálculo teórico, para predecir cuál de los procesos (mineralización-inmovilización) dominará en un suelo cuando el resto de paja es atacado por poblaciones puras, por ejemplo, por bacterias aerobias, actinomicetes, u hongos, cuya C/N promedio y la eficiencia en la asimilación del carbono, se determinó:

Eficiencia = (C celular formado/C total degradado) x 100

Las poblaciones más ineficientes en la asimilación del C son las bacterias anaerobias (liberan ácidos, alcoholes, gases). A partir de estos datos se pueden calcular las unidades de C asimiladas, las de N necesarias y si el resto vegetal provee de este nitrógeno o si, por el contrario, las células deben tomarlo también del ambiente.

Ejemplo: los hongos al atacar 100 partes de la paja asimilarán 30-40% del carbono que representa 40 partes en 100 partes del resto (C= 40%). O sea que incorporarán 12 a 16 unidades de carbono al citoplasma, lo que requerirá 1,2 a 1,6 partes de nitrógeno, si su C/N es en promedio 10/1. La paja provee sólo de 0,5 partes, de modo que habrá déficit y el resto debe tomarse del ambiente. Dominará la **inmovilización** (**i neta**) del N y el proceso será lento. **Como ejercicio complete el resto del cuadro.**

Cuadro 9- Cálculo teórico en la degradación de paja de cereal
(C=40% y N=0,5%), por cultivos puros de microorganismos

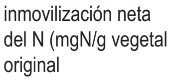
Organismo	Eficiencia	C/N	C asim	N asim	Déficit/exceso
hongos	30-40%	10/1	12-16	1,2-1,6	-0,7, -1,1 (**i neta**)
bacterias aerobias	10-30	10/1			
actinomices	15-30	5/1			

Abonos verdes

Materiales ricos en N% como los abonos verdes, las leguminosas (2-3% N%), no presentan esta limitante y el nitrógeno mineral puede aparecer en el suelo desde el comienzo de la degradación. Estas consideraciones teóricas basadas en datos de nutrición microbiana resultan difíciles de aplicar a la población microbiana en ambientes naturales ya que allí la heterogeneidad es enorme, en tipos de organismos, estado fisiológico y resulta difícil calcular las relaciones C/N y la eficiencia media en la utilización del carbono.

En general se admite que sustratos con más de 1,8% de N favorecen la mineralización neta; niveles entre 1,2 y 1,8% representan relaciones C/N entre 20 y 30/1 y contenidos entre 0,5 y 1,2% N favorecen la inmovilización neta.

Como dato, recordemos que las maderas contienen entre 0,1-0,5% de nitrógeno, las pajas de cereales y tallos de maíz entre 0,5 y 1,5% y restos de leguminosas entre 1,5 y 3%.



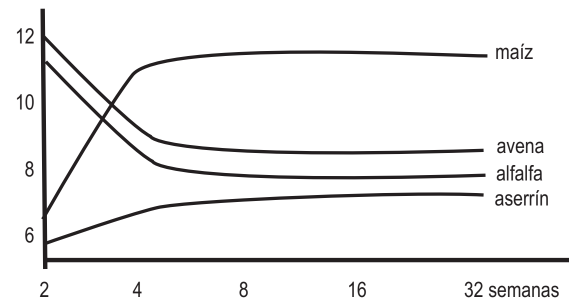


Figura 7- N inmovilizado en el suelo en la descomposición de algunos restos vegetales

La figura 7 muestra los cambios de inmovilización neta en materiales descompuestos con distinto contenido de N%. Para acelerar el proceso es frecuente fertilizar con nitrógeno.

Como consecuencia de la predominancia de la inmovilización sobre la mineralización en la primera etapa, el N mineral desciende (inmovilización neta). Luego y a medida que la C/N disminuye y se llega a la relación crítica, el N mineral comienza a aumentar, pudiendo incluso superar el nivel inicial (etapa de mineralización neta). Se acostumbra a medir el **tiempo de renovación o reciclaje del N mineral**, o sea el tiempo que transcurre entre la inmovilización y la aparición de N mineral nuevamente en el suelo. Este período es variable, se citan datos del orden de una jornada hasta varios años.

Con los demás elementos minerales ocurren procesos similares, pero las relaciones críticas C/P, C/S son más altas que para el nitrógeno. La figura 8 esquematiza los flujos de N, S, P en sustratos orgánicos ricos y pobres en nutrientes, en la descomposición y su disponibilidad para los cultivos.

La inmovilización de nutrientes en la biomasa microbiana puede alcanzar valores elevados, del orden de 100 kg de N, 80 kg de P, 70kg de K y 11 kg de Ca por ha. Como la biomasa es reciclada cerca de 10 veces más rápido que la fracción orgánica muerta, gran parte de estos nutrientes son liberados en su reciclamiento.

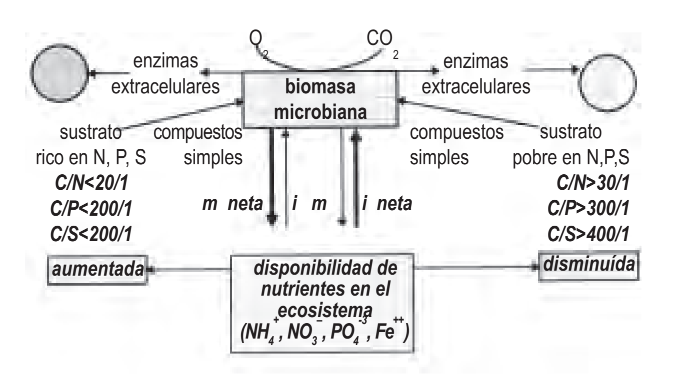


Figura 8- Flujo de nutrientes a través de la biomasa microbiana

Factores que afectan el ciclo de mineralización-inmovilización del nitrógeno

- **Estado del resto orgánico**: el material fresco y picado favorece su mineralización mientras que el secado provoca un aumento en la C/N de la fracción soluble en agua.
- **Temperatura**, las bajas temperaturas no afectan de la misma manera las distintas etapas de la mineralización. Así, vimos que las bajas temperaturas afectan más a la nitrificación que a la amonificación, que puede ocurrir en suelos a 5ºC y se duplica a 10ºC.
- **La humedad**: conjuntamente con la temperatura constituye una de las variables que más afecta al ciclo de mineralización-inmovilización del nitrógeno. La mayoría de los estudios analizan aisladamente el efecto de estos factores sobre la nitrificación y pocos sobre el proceso global de mineralización. La nitrificación es muy lenta a humedades cercanas al punto de marchitamiento donde se acumula amonio o nitrito. El óptimo se sitúa alrededor de 0,1 baria de tensión. El amonio se acumula tanto en sequedad como en inundación, mientras que a valores intermedios la producción de nitratos supera a la de amonio.
  En suelos secos, la menor actividad biológica trae aparejada menor inmovilización, al igual que en suelos sumergidos.
- **Fertilización nitrogenada:** la inmovilización es mayor en suelo cultivado dado que más materiales energéticos (raíces, exudados) y microorganismos, están presentes. Los primeros estudios con N^{15} ya mostraron que gran proporción del fertilizante permanecía en el suelo inmovilizado en combinaciones orgánicas. Es necesario tener en cuenta la adsorción del amonio a los coloides del suelo; en muchos ensayos todo el amonio no recuperado se atribuye a la inmovilización. El amonio es más inmovilizado que el nitrato ya que es fuente preferencial de N para los microorganismos.
- **pH:** la inmovilización del nitrógeno es escasa en suelos ácidos, en donde los procesos de mineralización se detienen en amonio. El encalado del suelo favorece la mineralización en detrimento de los procesos de reorganización, aunque es necesario tener en cuenta la interacción de este factor con otros como la humedad, la temperatura, etc. Los pH neutros favorecen ambas etapas del ciclo de mineralización-inmovilización.

- **La vegetación:** es frecuente observar nivel de nitratos inferior en la rizosfera en relación al suelo sin cultivos. Los procesos de inmovilización son allí estimulados por acción de la población heterótrofa aumentada. Pero los nitratos también disminuyen por aumento de la actividad desnitrificante y la presencia de sustancias inhibidoras de los nitrificantes excretadas por ciertos cultivos o producidas en la incubación del suelo.

En resumen: la degradación de los restos vegetales en el suelo es un fenómeno complejo y la dominancia de las etapas de mineralización o de inmovilización del nitrógeno depende de muchos factores, entre ellos, de la complejidad química de los sustratos, de las interacciones de la temperatura y la humedad, del tipo de suelo, del pH, de la incorporación simultánea de fertilizantes nitrogenados y otros nutrientes.

En el campo puede ocurrir inmovilización que afecta el desarrollo de cultivos posteriores, pero la magnitud y la duración de la misma son menores que las evaluadas en ensayos de laboratorio e invernáculo, y el nitrógeno puede ser aprovechado por los cultivos desde las primeras etapas de la descomposición.

Pérdidas de nitrógeno

En esta sección analizaremos las causas más importantes por las cuales las distintas formas químicas del nitrógeno son volatilizadas o convertidas en formas no aprovechables por los vegetales y la mayoría de los microorganismos.

Abiológicas

Volatilización del NH_3, puede ocurrir a partir del agregado de abonos a base de urea, amonio anhidro, sales amoniacales, pero también luego de la incorporación de restos vegetales. Las pérdidas son particularmente importantes en las siguientes situaciones:

- pH superior a 8,0 (suelos calcáreos o aquellos cuyo pH local se eleva por amonificación intensa)
- temperatura elevada y desecación
- aplicación de fertilizantes en la superficie del suelo
- suelos de baja capacidad de intercambio catiónico.

Las mayores pérdidas ocurren en suelos livianos, arenosos. Conviene mezclar los fertilizantes que liberan amonio con los primeros 5cm del suelo.

Reacciones que involucran a los nitritos

$$3\ HNO_2 \longrightarrow 2\ NO + HNO_3 + H_2O$$

Ciertos elementos, Cu y Mn, en suelos ácidos, reaccionan con los nitritos, liberando NO (óxido nitrico), que es bastante estable y puede pasar a la atmósfera: $\mathbf{NO + O_2 \longrightarrow NO_2}$ **ó** $\mathbf{N_2O_4}$**,** o ser absorbido por el suelo. Los óxidos de nitrógeno reaccionan con el agua del aire, a pH inferior a 5,5:

$\mathbf{N_2O_4 + H_2O + 0{,}5\ O_2 \longrightarrow 2\ HNO_3}$ Estas causas de pérdidas de N no son importantes, ya que poco nitrito puede formarse a pH ácido.

$\mathbf{HNO_2 + RNH_2 \longrightarrow N_2 + H_2O + ROH}$ (reacción de Van Slyke). También poco importante pues requiere acidez y aerobiosis.

$\mathbf{HNO_2 + NH_3 \longrightarrow NO_2NH_4 \longrightarrow 2\ H_2O + N_2}$ Reacción importante a pH alcalino.

Lavado, como vimos, parte del amonio, los nitritos y nitratos son solubles en agua y pueden por lo tanto ser llevados a horizontes fuera del contacto con las raíces.

Erosión, constituye en ciertas zonas una causa importante de pérdida de nitrógeno para el suelo, por voladura de suelos superficiales (erosión eólica) o por anegamiento con el consiguiente lavado y/o desnitrificación (erosión hídrica).

Biológicas

Los nitratos sufren una serie de procesos microbianos en ambientes naturales (aguas, suelos, barros) conocidos genéricamente con el nombre de **"reducción de los nitratos"**.

Pueden dividirse en dos grandes categorías:

a. Reducción asimilativa, realizada por microorganismos y vegetales y que conduce a la formación de amonio empleado en la biosíntesis de constituyentes nitrogenados de la célula. No implica pérdida de N para el ecosistema, sino una **inmovilización transitoria** hasta

que se mineralicen las células o los productos nitrogenados excretados.

b. Reducción desasimilativa o respiración de los nitratos: muchos microorganismos en anaerobiosis total o parcial sustituyen el O_2 por los nitratos como aceptor de electrones en respiraciones anaerobias, generando ATP y poder reductor. De acuerdo al organismo y a las condiciones del medio, los productos finales pueden ser: **NH_4^+, NO, N_2O, NO_2^-, N_2** y aún otras formas del nitrógeno, que serán excretados por las células al medio. Otros pueden reducirlos hasta amonio.

Si el **N_2 ó el N_2O** son los productos formados en la respiración de los nitratos, el proceso recibe el nombre de **desnitrificación**.

Metodología: la cromatografía de gases permite seguir con mucha precisión el contenido de N_2 y N_2O en la atmósfera del suelo y el empleo de N^{15}-NO_3^- permite evaluar con exactitud estas causas de pérdidas de nitrógeno. Actualmente se trata de evaluar esta importante causa de pérdida de fertilizantes en suelos y aguas, aplicando técnicas de evaluación tanto *in-vitro* como *in-situ*.

Las reacciones pueden iniciarse con nitritos o nitratos y los productos finales se pierden a la atmósfera (cuadro 10).

Cuadro 10- Procesos que involucran reducción de nitratos

Procesos	Productos	Energía conservada	Regulada por	Condiciones del suelo
Asimilativo Asimilación o inmovilización de nitratos	NH_4^+	no	NH_4^+, N-org	baja conc.NH_4^+
Desasimilativo				
*quimiodesnitrificación	NO más que N_2	no		ácidas
*desnitrificación no respiratoria	N_2O	no	?	aeróbica
* respiración NO_3^- (*)	NO_2^-	si	O_2	anaeróbica
*NO_3^- reducción desasimilativa a NH_4^+	NH_4^+ N_2O	pocas cepas	O_2	anaeróbica
*desnitrificación respiratoria	N_2 N_2O NO	si	O_2	anaeróbica

En suelos ácidos de pH 5,0 o menor, los gases nitrogenados pueden producirse químicamente, con NO a partir de nitritos. En la mayoría de los suelos, la desnitrificación respiratoria constituye la principal causa de pérdidas de nitratos. En la llamada desnitrificación no respiratoria (Mayrold, 1998), los organismos producen óxido nitroso en condiciones aerobias, pero no obtienen energía de este proceso que es realizado por numerosas bacterias, hongos y algas. Con excepción de pocos géneros, (*Lactobacillus, Fusarium*), la fracción de nitratos convertida, es en general menos de 25%, pero su importancia en la naturaleza no está bien determinada.

Bacterias que respiran nitratos convirtiéndolo a nitrito en condiciones anaeróbicas, obtienen energía por fosforilización oxidativa (368kcal mol^{-1} NO_3^-). Bacterias entéricas, que son anaerobios facultativos, son ejemplos típicos, a pesar de que muchos de ellas pueden también reducir nitratos a amonio, proceso conocido como **reducción desasimilativa de nitratos a amonio,** bajo condiciones anaerobias por varios géneros bacterianos:

$$NO_3^- + 4H_2 + 2H^+ \longrightarrow NH_4^+ + 3H_2O$$

Se transfieren un total de 8 electrones en la reducción, con rendimiento energético de 143 kcal mol^{-1} de nitrato. La primera etapa es la reducción de los nitratos a nitrito, ligada a la producción de energía por fosforilación oxidativa por respiración. Muchas especies bacterianas que realizan este proceso no ganan energía adicional por la reducción de los nitritos a amonio.

Los investigadores se preguntan sobre las ventajas de esta reducción de los nitratos a amonio, dada la escasa energía generada. Para algunos esta energía serviría para regenerar poder reductor reooxidando los $NADH_2$. Estas observaciones en cultivos puros se correlacionan con estudios ecológicos: las bacterias que reducen nitratos a amonio predominan en ambientes ricos en carbono (mayor necesidad de poder reductor), como los sedimentos y aguas servidas, mientras que los desnitrificantes (reducción de los nitratos a N_2, N_2O) dominan en ambientes pobres en carbono, como los suelos.

Desnitrificación

Efectos en la naturaleza

- **los vegetales** se perjudican ya que los nitratos son su principal fuente de nitrógeno
- **el ambiente** se beneficia ya que los nitratos altamente tóxicos y solubles son lavados del suelo y llevados a cauces de agua. La desnitrificación es vital en la continuidad del ciclo del nitrógeno. Si no ocurriera este proceso, el nitrógeno de la tierra, incluyendo el N_2 atmosférico, se acumularía en los océanos, impidiendo la vida terrestre. La desnitrificación mantiene también la potabilidad de las aguas, ya que altas concentraciones de nitratos son tóxicas.

Microorganismos responsables

Los microorganismos vinculados a la desnitrificación no dependen de los nitratos para su desarrollo. Muchos de ellos son también activos en la proteolisis, amonificación y otras transformaciones biológicas. La presencia de una alta población desnitrificante en suelos, aguas, no implica que las condiciones sean las óptimas para el proceso; se refleja solamente un gran **potencial desnitrificante**.

Así, la capa arable de suelos contiene más de 10^6 desnitrificantes/g suelo seco. La población es mayor en la vecindad de las raíces y el potencial de volatilización es grande, pero deben reunirse las condiciones para que los organismos cambien su metabolismo aerobio por una respiración anaerobia, con nitrato como aceptor final de electrones.

Son bacterias auto y heterotróficas anaerobias facultativas con dos cadenas transportadoras de electrones

- **en aerobiosis** realizan respiraciones aerobias del sustrato, por ejemplo, glucosa

- **en anaerobiosis** degradan el mismo sustrato por respiración anaerobia con nitrato como aceptor de electrones

Un 85% de las especies testadas pueden reducir nitratos a nitritos. El grupo que reduce los nitratos hasta amonio es también amplio, un 45% del total, e incluye a la mayoría de las especies amonificantes, que también pueden reducir nitratos. Estos grupos no ocasionan pérdidas de N, ya que nitrito y amonio son empleados por la microflora.

Los **desnitrificantes verdaderos** que reducen nitratos hasta N_2 u óxido nitroso, sólo representan un 4% de las especies testadas y son bacterias típicas. Ningún protista superior es capaz de obtener energía de esta reacción Son especies de pocos géneros: *Pseudomonas, Achromobacter, Bacillus, Spirillum, Micrococcus.*

Son anaerobias facultativas, que emplean nitratos en condiciones de anaerobiosis o de muy baja concentración de O_2 (0,2 mg/L en medio líquido). El O_2 reprime la formación nitrato, nitrito y óxido nitroso reductasa y además inhibe la función de la que ya está sintetizada.

Aislamiento: en condiciones de anaerobiosis, con nitrato y donadores de electrones, en general orgánicos, ya que la mayoría de las especies son heterótrofas. Luego de un enriquecimiento producen gran cantidad de gas y alcalinizan la solución. Muchas especies de *Bacillus* son termófilas y se aislan a 55-65ºC.

Heterótrofos: $CH_3COOH + NO_3^- \longrightarrow CO_2 + N_2 + H_2O + OH^-$

Sustrato: innumerables moléculas resultantes de la degradación de polímeros: celulosa, hemicelulosas, almidón se usan como fuente de carbono, asi como algunos compuestos aromáticos y sintéticos.

Las asociaciones **comensalísticas** entre los degradadores de estos polisacáridos y las bacterias desnitrificantes han sido descriptas como muy frecuentes. Con raras excepciones los desnitrificantes son incapaces de fermentar azúcares y no pueden crecer en anaerobiosis sin nitratos ni nitritos. Ninguno es anaerobio estricto.

Autótrofos: se citan en la bibliografía unas pocas especies de bacterias autótrofas facultativas, que realizan desnitrificación oxidando un sustrato mineral, H_2, Sº, que se desarrollan en el aire o anaeróbicamente con compuestos inorgánicos como fuente de energía y O_2 o NO_3^- como aceptores de electrones, respectivamente.

Thiobacillus denitrificans oxida S°, H_2S y difiere de los otros thiobacilos por su capacidad para crecer anaeróbicamente cuando están presentes los nitratos:

$$S^o, S_2O_3^= + NO_3^- + H_2O \longrightarrow SO_4^= + N_2 + H^+$$

Hidrogenomonas agilis y Micrococcus denitrificans oxidan el H_2 con reducción de nitratos. *Sporovibrio ferrooxydans* reduce nitrato en anaerobiosis, oxidando Fe^{++}.

El rol de estos organismos en naturaleza no se puede inferir a partir de estudios en cultivo puro. De todos modos, su número no es nunca alto en ecosistemas naturales y las mayores pérdidas de nitratos se producen por los heterótrofos.

Ecología

La restricción de la actividad desnitrificante a pocos géneros hace que la magnitud el proceso esté marcadamente afectada por el ambiente. Los cambios en éste pueden estimular o bien inhibir las pérdidas de nitratos.

Las condiciones que deben reunirse para que el proceso heterótrofo sea estimulado:

- **alto nivel de nitratos**,
- **sustancias donadoras de electrones** (materia orgánica)
- **anaerobiosis**

Los nitratos se producen por nitrificación o son aportados en fertilizantes nítricos, amoniacales u orgánicos que pueden ser llevados a nitratos. También pueden provenir de otros horizontes arrastrados por el agua. Incluso en suelos de arrozales donde en general se fertiliza con amonio, éste puede oxidarse a nitrato en las capas superiores del agua y luego ser desnitrificado más abajo.

La anaerobiosis se logra fácilmente en aguas, a unos pocos centímetros de la superficie y en los suelos existen microagregados en los cuales la demanda biológica agota rápidamente el O_2 y como éste es un gas que difunde lentamente por los poros del suelo y es poco soluble en agua, se crean ambientes anaerobios en el seno de suelos bien estructurados.

Pero el oxígeno ejerce además un rol indirecto, ya que es requerido para la producción de nitratos. La desnitrificación se favorece en agregados de más de 4 mm de diámetro ya que resulta difícil al O_2 llegar por difusión hasta el centro donde ocurrirá la desnitrificación. El suelo está constituido por un mosaico de habitats, coexistiendo los oxigenados para la oxidación del amonio y los anaerobios, donde se reducen los nitratos.

La **alternancia** de períodos de buena y mala aereación, o períodos de lluvia intermitentes pueden facilitar la formación y la reducción consiguiente de los nitratos.

El cuadro 11 muestra la relación entre el nitrógeno perdido como gas y la atmósfera de incubación de los nitratos.

Cuadro 11- Efecto de la composición de la atmósfera en la desnitrificación

	N perdido como % del N-NO_3^- agregado	
atmósfera	**agitado**	**estacionario**
aire	28,2	81,0
oxígeno	0,0	28,0
nitrógeno	80,1	79,2
vacío	78,6	80,0

La materia orgánica estimula la desnitrificación, pues como ya vimos la mayoría de las especies activas son heterótrofas. Ejerce doble rol:

- **directamente**, actúa como fuente de carbono y de electrones e **indirectamente**, provoca una eclosión de microorganismos en su mayoría aerobios, que disminuyen el nivel de oxígeno facilitando las pérdidas por desnitrificación.

La figura 9 presenta las pérdidas de N en el suelo incubado con nitratos (5 mg de N-NO_3^-) en anaerobiosis a 25ºC y diferentes dosis de paja de trigo. Las sustancias rápidamente descomponibles favorecen el proceso: azúcares simples, ácidos orgánicos. Los abonos verdes estimulan el proceso y las pajas en menor proporción.

Otros factores

Humedad: en suelos bien drenados la desnitrificación se correlaciona con el nivel de humedad. Los nitratos se re-

ducen en altos niveles de agua y en suelos mal drenados. Pueden coexistir, como vimos, habitats anaerobios (interior de agregados, rizosfera) en suelos aereados.

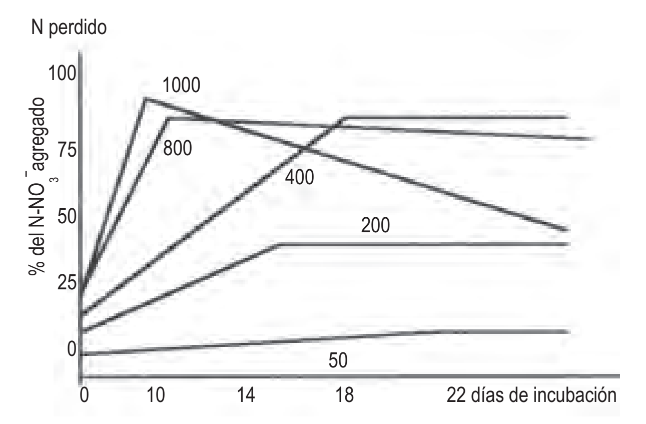


Figura 9- Efecto de la materia orgánica (mg/kg) en la desnitrificación

La alternancia de períodos de buena y mala aireación ejerce un efecto acelerador de las pérdidas de N por desnitrificación. La figura 10 muestra la evolución del nitrógeno total (Nt) y del $N\text{-}NO_3^-$ en un suelo incubado a 35ºC durante 60 semanas en tres condiciones:

a. mantenido constantemente a 16-20% de humedad
b. mantenido siempre saturado en agua
c. saturado en agua la primera mitad del ciclo (3 semanas) y secado hasta 18% de humedad y mantenido así la segunda mitad del ciclo (3 semanas).

Se repite el procedimiento en cada uno de los ciclos. El suelo permanentemente saturado volatiliza los nitratos pero no puede producirlos más en anaerobiosis. La alternancia de saturación y drenaje causa la mayor pérdida de Nt: en saturación el humus se mineraliza lentamente a amonio, que es oxidado a nitrato en la segunda parte del ciclo, perdiéndose en el período de anegamiento.

Como consecuencia parte del N del humus se volatiliza.

Este principio se aplica en las plantas de **tratamientos de aguas servidas**; ciclos de aerobiosis y anaerobiosis eliminan prácticamente todo el nitrógeno orgánico por nitrificación y desnitrificación. En columnas de suelo se observó que en ciclos de 10 días húmedos y 10 días secos se pueden remover un 67% del N de la materia orgánica.

pH: la desnitrificación es sensible a la acidez y las pérdidas en ambientes muy ácidos no pueden atribuírse directamente a causas biológicas. Sobre el pH 6,0 se forma N_2O pero se reduce a N_2 que es el gas dominante. Debajo de pH 6,0 la reducción es inhibida y predomina el óxido nitroso: la producción de N_2O es máxima en suelos ácidos y mínima en neutros. La reducción ulterior N_2O a N_2 se produce en todos los casos. El óptimo del grupo se sitúa en el rango **neutrófilo**: **7,0 - 8,2** coincidente con la máxima actividad bacteriana, pero los rangos se extienden desde **pH 4,5 a 10,0**.

Temperatura: el proceso ocurre lentamente a bajas temperaturas (2ºC) y la velocidad de pérdida de nitratos aumenta con la temperatura. El óptimo para algunos autores se sitúa en el rango **termófilo** (40-75ºC). La desnitrificación a bajas temperaturas tiene gran significado agrícola ya que posibilita pérdida de nitrógeno en las estaciones frías cuando el suelo no posee una cubierta vegetal que absorba a los nitratos. Es aconsejable mantener una vegetación extendida que puede luego ser enterrada evitando pérdidas de nitrógeno.

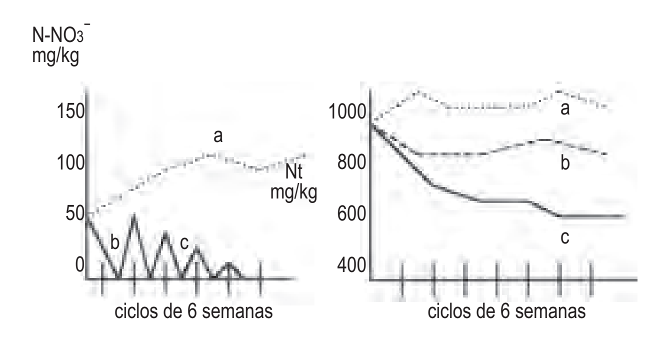


Figura 10- Pérdidas de N en suelo sometido a distintos tratamientos

El cuadro 12 muestra el efecto de la temperatura de incubación en la desnitrificación de nitratos en 30 días en suelo inundado con glucosa. Se verifica el óptimo en el rango termófilo.

Cuadro 12- Pérdidas de N en un suelo inundado con nitratos y glucosa a distintas temperaturas

(% N-NO_3^- agregado)											
temperaturaºC	2	10	13	16	20	25	30	40	50	60	70
N-perdido	20	80	80	83	85	87	92	91	90	92	0

La vegetación ejerce también un doble efecto sobre la desnitrificación: aporta donadores de electrones por exudación, restos de raíces, mantillo y, por otro lado, compite con las bacterias por el nitrato disponible, reduciendo las pérdidas por volatilización. El efecto neto parece ser **estimulante** y el número de bacterias desnitrificantes es elevado en la rizosfera. La profundidad limita el proceso por disminución de la materia orgánica.

En resumen La desnitrificación requiere aporte de compuestos orgánicos rápidamente metabolizables como son los azúcares, o bien minerales para los autótrofos como Sº, Fe^{++}, H_2, alto nivel de nitratos y pobre drenaje.

Pero la magnitud del proceso está también gobernada por la temperatura, el pH, la humedad, que regula la aireación. La volatilización es importante en aguas estancadas y en suelos bien drenados y con activa nitrificación, que sufre períodos de anaerobiosis parcial en épocas de lluvias o luego de la aplicación de restos orgánicos. Es menor en suelos permanentemente anegados por la imposibilidad de formación de nitratos. Las pérdidas son importantes en zona tropical y en la zona templada en praderas. Cerca de la superficie del suelo el nivel de materia orgánica, nitratos y microflora activa es mayor y es allí donde se forma mayor cantidad de nitratos que se pueden desnitrificar antes de llegar a la zona radical, en anaerobiosis.

Como práctica agrícola conservacionista se aconseja agregar los donadores de electrones: materia orgánica como abonos verdes, rastrojos, etc. fraccionadamente en el tiempo, evitando su acumulación y el empleo de fertilizantes amoniacales y no nítricos e incluso el empleo de inhibidores de la nitrificación.

Bioquímica de la desnitrificación

El esquema siguiente presenta los posibles mecanismos:

$$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO$$
$$NO_2^- \downarrow HNO \rightarrow H_2N_2O_2 \rightarrow N_2O$$
$$H_2N_2O_2 \downarrow NO_2NH_2 \rightarrow N_2 \qquad N_2O \downarrow N_2$$

La reducción de nitrato a nitrito es catalizada por un nitrato reductasa.

En bacterias esta conversión constituye la primera etapa de dos vías metabólicas diferentes: una respiratoria que conduce a N_2O o N_2 (desnitrificación) y la otra asimilativa que lleva a NH_3. Algunas especies asimilan y respiran los nitratos: *Aerobacter aerogenes*, *Micrococcus denitrificans*. La nitrato reductasa de *P. aeruginosa* es una sulfihidril molibdo flavoproteína específica para NADH y funciona con el citocromo c:

$$NADH \rightarrow FAD \rightarrow cit_c \rightarrow NO_3^- \text{ reductasa} \rightarrow NO_3 \rightarrow NO_2^-$$
$$cit_c \downarrow \text{cit. oxidasa} \rightarrow O_2 \rightarrow H_2O$$

La nitrato reductasa (Mo-Fe proteína no hemínica) es inhibida por el O_2 que reprime su biosíntesis. El paso siguiente: NO_2^- NO es mediatizado por una nitrito reductasa, que según el organismo es una hemoproteína con dos hemos de tipo c y d o una cuproproteína, ambas solubles, que emplean el NADH o FADH. Se formaría un intermediario hipotético, el nitroxilo, tal vez en forma de complejo con la enzima.

Resumen

Como vimos el ciclo del nitrógeno es complejo y el conocimiento de su funcionamiento en ecosistemas naturales es de sumo interés a los efectos de lograr mayor productividad y sustentabilidad y para mejorar los problemas del ambiente. La mayoría del N de los suelos se encuentra en formas orgánicas que liberan lentamente las formas minerales más dinámicas. Los procesos de mineralización-inmobilización gobiernan el nivel de minerales y la relación C/N de la materia orgánica en descomposición es uno de los factores que regulan estos procesos. La amonificación es un proceso más difundido y menos específico y exigente que el paso siguiente, la nitrificación.

Los nitratos tienen múltiples destinos en la naturaleza: es tomado por los vegetales y los microorganismos, es muy

móvil y se lava (pérdidas y riesgos de polución) y finalmente se pierde en la atmósfera como gases, por la desnitrificación (N_2 y N_2O). El óxido nitroso es muy peligroso por su marcado efecto invernadero, con destrucción de la capa de ozono. Esta última ocurre en anaerobiosis, pero también en suelos aireados, dentro de micrositios o agregados donde se establece anaerobiosis. La alternancia de ciclos de aireación y saturación estimulan estas pérdidas. Las bacterias responsables son anaerobias facultativas.

Finalmente el ciclo del nitrógeno se cierra por el proceso de fijación del N_2, el cual es la fuente última de este elemento en la naturaleza.

El cuadro 13 resume algunas consideraciones sobre futuros desafíos relacionados a este importante elemento.

Cuadro 13- Perspectivas y opciones de manejo en relación al ciclo global del N

- El uso de fertilizantes N en el 2020 podría alcanzar 134.10^9 kg año^{-1}
  - necesidad de mayor énfasis en utilización eficiente del N
  - reinstalar cultivos inundados para prever pérdidas de N hacia estuarios
- El consumo de combustibles fósiles en el 2020 podría llegar a ~46. 10^9 kg N año^{-1}.
  - necesidad de consumo eficiente de combustibles fósiles
  - otras alternativas energéticas: biodiesel, H_2

Bibliografía

Dommergues, Y., Mangenot, F. **Ecologie microbienne du sol,** 1970, Masson, París

Frioni, L. **Procesos microbianos**, 1999, Fundación de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina,

Mayrold, D. D. Transformations of Nitrogen, En: **Principles and Applications of Soil Microbiology** 1998, Sylvia, D. M., J. J. Fuhrmann, P. G. Hartel, D. A. Zuberer, (eds)**,** Prentice Hall, New Jersey, 259-294

Stevenson, F. J. & M. A. Cole, (eds) **Cycles of Soils: carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur, micronutrients**, 1999, Wiley & Sons, New York: 139-229

Preguntas de repaso

1) Dibuje su propio diagrama del ciclo terrestre del N, incluyendo las principales fuentes y las transformaciones que puede sufrir.
2) Describa la composición del N-orgánico y su relación con su biodegradación.
3) A partir de los siguientes sustratos, analice las enzimas involucradas en su mineralización, los productos intermediarios y finales:

Sustrato	enzimas	productos
Proteínas		
Péptidos		
Quitina		
Peptidoglicano		
ARN, ADN		
Urea		

4) Describa la formación de nitratos y las vías que puede seguir en el suelo.
5) Ciclo interno del nitrógeno.
6) Compare los procesos de nitrificación y desnitrificación en relación a la microflora actuante y los mecanismos de obtención de energía en cada caso.
7) ¿Por qué una alternancia de aerobiosis/anaerobiosis estimula la pérdida de nitrógeno de los ecosistemas terrestres?
8) Desnitrificación en la rizosfera: ¿es estimulada? ¿Cómo evidenciaría el efecto neto en este ambiente?
9) Un residuo vegetal (45%C y 1,5%N) es picado y mezclado en el suelo. Asumiendo que la biomasa microbiana tiene una relación C/N de 8/1 y la eficiencia en el uso del carbono de la población es del 40%, calcule si dominará la mineralización o la inmovilización neta. Explique sus resultados.
10) Analice las causas de pérdidas de nitrógeno en ecosistemas naturales y formas a implementar para evitarlas.

11 Fijación biológica del nitrógeno (FBN)

El nitrógeno es un elemento fundamental para los seres vivos y el desarrollo vegetal muchas veces se ve limitado porque los suelos contienen poco nitrógeno. La fertilización con compuestos nitrogenados orgánicos o inorgánicos es una práctica frecuente.
El nitrógeno del suelo se origina a partir de la reserva inagotable que constituye la atmósfera, en donde se lo encuentra como gas diatómico (N_2) muy inerte debido a la alta energía de enlace, superior a la que se presenta entre los compuestos del carbono (cuadro 1) (Frioni, 1999).

Cuadro 1 - Energía de enlace en compuestos con carbono y nitrógeno (kcal/mol)

C-C	92	N-N	38
C=C	146	N=N	98
C≡C	192	N≡N	225

En la naturaleza el nitrógeno se presenta en numerosos compuestos con estados de oxidación que van desde (+5) a (-3):

(+ 5) ácido nítrico (HNO_3)
(+ 4) dióxido de N (NO_2)
(+ 3) ácido nitroso (HNO_2)
(+ 2) óxido nítrico (NO)
(+ 1) óxido nitroso (N_2O)
(0) dinitrógeno (N_2)
(- 1) diimida (N_2H_2)
(- 2) hidrazina (N_2H_4)
(- 3) amoníaco (NH_3)

Este proceso microbiano es realizado por un grupo limitado de protistas inferiores llamados también **diazotrofos (**diazo=N_2, trofo=nutrición) a temperaturas y presiones normales, gracias a la acción de una enzima muy compleja, **la nitrogenasa.** El N_2 se reduce también por vías no biológicas.

a. Esquema del proceso biológico de fijación biológica del nitrógeno (FBN)

$$N_2 \xrightarrow[N_2asa]{8\,e^-,\ 8\,H^+} 2NH_3 + H_2$$

$2NH_3 \longrightarrow$ aminoácidos, ureídos

donadores de e^-
12-24 moles ATP/mol de N_2
Mg, Fe, Co
protección frente al O_2
esqueletos carbonados

Se estima que por esta vía se fijan al año cerca de 170 millones de toneladas de nitrógeno por organismos en vida libre, asociados a vegetales no simbióticamente y en formaciones nodulares simbióticas (cuadro 2).

b. Procesos abiólogicos en la atmósfera
De importancia cuantitativa menor, se estiman unos 10-20 x 10^6 toneladas de N/año, o sea un 10% del total fijado.

Algunos de los procesos

$N_2 + O_3$ (ozono) $\longrightarrow N_2O + O_2 \longrightarrow$ ozonización del N_2
$N_2O \longrightarrow NO + N \longrightarrow$ fotólisis del N_2O
$NO + O_3 \longrightarrow NO_2 + O_2 \longrightarrow$ ozonización del NO
$3NO_2 + H_2O \longrightarrow 2HNO_3 + NO \longrightarrow$ hidratación del NO_2
$NH_3 + O \longrightarrow NO_3^- \longrightarrow$ oxidación del NH_3

c. Procesos industriales, como el de Haber-Bosch (1914)

$$N_2 + H_2 \longrightarrow 2NH_3$$

1000ºC
200-300 atmósferas
catálisis inorgánica

Este proceso representa menos del 30% de la fijación total mundial. Vimos que otro 10% provendría de los procesos no biológicos realizados en la atmósfera, es de suponer entonces que más de un 60% del total de nitrógeno que se incorpora cada año en el suelo y aguas provendría de la FBN.

Cuadro 2 - Fijación biológica del nitrógeno atmosférico y flujo anual de N en términos globales

Fuente de fijación	x 10^6 toneladas/año
industrial (fertilizantes)	49
atmosférica (electroquímica)	10
otros procesos químicos	35
FBN total	170
sistemas simbióticos	50
total en sistemas terrestres	139
Leguminosas	35
arbóreas (100-300 kg/ha/año)	
granos (40-240 kg/ha/año)	
abonos verdes (100-360 kg/Ha/año)	
cultivo de arroz (10-80 kg/ha/año)	4
pasturas (15kg/ha/año)	45
otros cultivos (5kg/ha/año)	5
ecosistemas forestales (10kg/ha/año)	5
otros ecosistemas (2kg/ha/año)	10
cantidad N en suelos	105.000
absorción total de N	1.400
N mineralizado	3.500
N desnitrificado	135
N perdido por erosión/lavado	85

La producción de fertilizantes químicos requiere una energía muy considerable para separar el H_2 del gas natural o del petróleo, menos cantidad para comprimir los reactivos y calentarlos y otra importante cantidad para el traslado y distribución desde las plantas industriales al campo. La necesidad de conservar los combustibles fósiles, el carbón, el metano y el petróleo incentiva las investigaciones sobre la FBN.

Proceso bioquímico de la fijación del N_2

La fijación biológica del N_2 consiste en la reducción del gas dinitrógeno hasta **amonio**; los intermediarios postulados son **diimida e hidrazina**, aunque aún no han sido aislados. El amonio es rápidamente convertido en aminoácidos, proteínas y luego en todas las moléculas nitrogenadas requeridas por la célula. El amonio formado se combina con moléculas carbonadas provistas por la célula fijadora en caso de fijación por organismos en vida libre, o por la actividad fotosintética del huésped, en caso de asociaciones con vegetales. Ocurren reacciones del tipo de las siguientes:

$$HOOC\text{-}CO\text{-}CH_2\text{--}COOH + NH_3 \longrightarrow NH_2\text{-}CHCOOH\text{-}CH_2\text{-}CH_2COOH + H_2O$$

ác. alfa-ceto glutárico — ác. glutámico deshidrogenasa — ác. glutámico

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + NH_3 \longrightarrow CH_3\text{-}CH\text{-}(NH_2)\text{-}COOH + H_2O$$

ác. pirúvico — alanina

Requisitos

Poder reductor: la fijación biológica del N_2 es un proceso reductivo y numerosos compuestos orgánicos pueden ser empleados por los microorganismos fijadores heterótrofos como fuente de carbono, energía y poder reductor.

La **ferredoxina y la flavodoxina** pueden actuar de donadores de electrones *in vivo* y el metil viológeno y ditionito de sodio se emplean como donadores no fisiológicos en sistemas *in vitro*.

Las **ferredoxinas** son proteínas-SFe, capaces de reducir la nitrogenasa cuyo potencial redox de -0,43 voltios puede variar en un determinado rango según los componentes de la proteína. Las **flavodoxinas** son proteínas sin hierro que poseen un flavin-mononucleótido (FMN) como grupo prostético. Están codificadas por el gen **nifF** y son capaces de transportar dos electrones. En *Klebsiella pneumoniae*, el donador de electrones a la enzima es una flavodoxina que es reducida directamente por la piruvato-reductasa, codificada por el gen **nifJ**. El formiato es un importante donador de electrones en organismos fijadores aerobios y anaerobios facultativos. El H_2 ha sido descrito como efectivo donador de electrones en extractos acelulares de *Clostridium pasteurianum.*

En los organismos fotosintéticos la fuente de poder reductor proviene del flujo electrónico derivado de la clorofila.

Energía (ATP): en términos fisiológicos la fijación del N_2 es un proceso muy costoso para la célula. Se calculan entre 12 y 24 los ATP requeridos para reducir un mol de N_2. Esta molécula se genera en la célula por los procedimientos habituales:

- **fosforilizaciones oxidativas** en organismos aerobios
- **fosforilaciones a nivel del sustrato** en anaerobios
- **fotooxidaciones** en organismos fotosintéticos

En estudios *in vitro* se han utilizado sistemas artificiales de generación de ATP, no empleando ATP puro, pues se comprobó que la acumulación de ADP inhibe a la nitrogenasa.

Resumiendo:

- en los organismos **heterótrofos** los compuestos orgánicos son empleados como fuente de carbono, de poder reductor y de energía
- en los **fotosintéticos,** es el flujo electrónico derivado de los sistemas pigmentarios, el que llega a reducir simultáneamente al N_2 y al CO_2

Metales: constituyen otro requerimiento imprescindible para la nitrogenasa. El magnesio reacciona con el ATP para dar la sal monomagnésica, que reacciona con la nitrogenasa, según los modelos que explican el funcionamiento de esta enzima. Otros minerales presentes en la nitrogenasa son el hierro y el molibdeno. Suelos carentes en estos elementos limitan la fijación.

La nitrogenasa es la enzima responsable de la reducción y dada su complejidad resulta muy difícil de purificar. Además, por su extremada sensibilidad frente al O_2 los trabajos *in-vitro* se han limitado en el tiempo. Recién en 1960, se logró purificar la enzima a partir de un organismo anaerobio, el *Clostridium pasteurianum.* Hacia 1974 se lograron aislamientos a partir de unos 25 microorganismos, incluidos los aerobios, pero trabajando siempre en ausencia de O_2.

La enzima está integrada por dos componentes, dos metaloproteínas fácilmente separables que recibieron distintos nombres según los laboratorios que las purificaron.

El componente I, también denominado Mo-Fe proteína, Azofermo, dinitrogenasa y está formada por 4 subunidades de cadenas polipeptídicas. En *Azotobacter* su PM es de 220.000 y posee 22-24 átomos de Fe y 2 de Mo. Vida media en el aire: hasta 20 minutos.

- **El componente II, o Fe proteína o Azofer, ferroproteína, dinitrogenasa reductasa,** PM 55.000-66.000, posee 2 subunidades proteicas con 4 átomos de Fe y uniones sulfuro lábil., vida media en el aire 0,5-0,75 segundos. El complejo estaría en equilibrio dinámico con sus dos componentes:

$$\textbf{Proteína Mo-Fe + 2 Proteína Fe} \longrightarrow \textbf{N}_2\textbf{asa}$$

Extractos con actividad nitrogenasa se han preparado a partir de organismos diferentes: aerobios, anaerobios, microaerofílicos y algunas cianobacterias y sistemas simbióticos con leguminosas y no leguminosas. Se han aislado nitrogenasas que no dependen del Mo, sino del vanadio (V) (nitrogenasa 2) y otra que no depende ni del Mo ni del V, la nitrogenasa 3, que es una FeFe-proteína, con propiedades y afinidades por los sustratos diferentes a la clásica nitrogenasa. Son las llamadas **nitrogenasas alternativas**.

La figura 1 (Gonzalez-Lopez, Lluch-Plá, 1992) presenta modelo de flujo electrónico en esta enzima y otros sustratos reducidos también por el complejo enzimático.

Sustratos de la enzima

El dinitrógeno es el sustrato natural de la enzima, es reducido a amonio en una reacción irreversible que va acompañada de la liberación de H_2. La relación entre H_2 producido/N_2 reducido puede variar según las nitrogenasas de los microorganismos, pero nunca es inferior a 1.

$$N_2 + 16\,ATP + 8\,e^- + 10\,H^+ \longrightarrow 2NH_4^+ + H_2 + 16\,Pi$$

Hasta la década de 1960 se pensaba que el dinitrógeno era el único sustrato de la enzima, pero se evidenció que la reacción era inhibida por determinados "análogos" del N_2, pequeñas moléculas con triple enlace, como el acetileno,

cianuro, azidas, etc. (Zuberer, 1998). Se demostró que estas moléculas son sustratos que podían ser reducidas por la enzima (cuadro 3). El acetileno es un inhibidor no competitivo de la reducción del N_2 (figura 1), mientras que el N_2 inhibe competitivamente la reducción del acetileno

Inhibidores

El H_2 es un inhibidor competitivo de la reducción del N_2, pero no de la de protones, ni de otra reducción catalizada por la enzima. El O_2 inactiva ambos componentes de la N_2asa, actúa como inhibidor no competitivo. El mecanismo no está totalmente dilucidado, puede relacionarse con la expresión de los genes **nif** o con la formación de **radicales libres** (superóxidos) generados en el ambiente altamente reductor donde funciona la enzima.

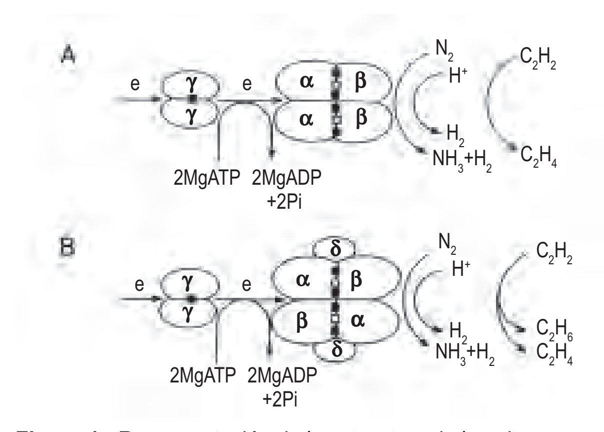


Figura 1 - Representación de la estructura de las nitrogenasas

A) nitrogenasa dependiente del Mo. B) nitrogenasas alternativas
Las subunidades γ forman parte de la Fe-proteína, la δ es específica de las nitrogenasas alternativas, los centros 4Fe-4S ❐ y cofactores ■ se localizan en cada proteína.

Cuadro 3 - Sustratos de la nitrogenasa

Sustrato	Km(mM)	Productos
dinitrógeno	0,1	NH_3, H_2
azida $(N{\equiv}N\text{-}N^-)^-$	1,0	N_2, NH_3, N_2H_4
cianuro $(C{\equiv}N)^-$	0,4	CH_3NH_2, NH_3, CH_4
óxido nitroso (N_20)	1,0	N_2, H_20
acetileno $CH{\equiv}CH$	0,1	C_2H_4
protones H^+	-	H_2
alquilcianuro (R-C≡N)	10	RCH_3, NH_3

Protección frente al oxígeno

La fijación de N_2 requiere un acoplamiento eficiente entre los sistemas generadores de ATP, que en muchos diazotrofos es la fosforilación oxidativa y la protección de la nitrogenasa frente al oxígeno. Teóricamente todos los diazotrofos protegen a la enzima según distintas estrategias.

Polímeros extracelulares: cápsulas y capas mucosas limitan el flujo de oxígeno a la célula.

Microaerofilia: diazotrofos aerobios migran hacia regiones de baja tensión de O_2 donde pueden expresar la nitrogenasa.

Protección respiratoria: una intensificación del proceso respiratorio permite la reducción del O_2 a concentraciones inocuas para la enzima. Proceso descrito en *Azotobacter*, se induce un cambio en la actividad de los citocromos de la CTE y un desvío del flujo de electrones que estimulan el consumo de O_2 hacia oxidasas terminales alternativas. La respiración es más ineficiente y produce menos ATP/mol de sustrato.

Protección conformacional: cultivos de *Azotobacter* poseen este mecanismo relacionado a modificaciones bioquímicas de la enzima (se combina equimolecularmente con una tercera SFe-proteína llamada SFeII en presencia de iones Mg).

Inhibición reversible: un mecanismo alternativo propuesto para *Klebsiella y Rhodopseudomonas* está relacionado en la competencia entre dos sistemas enzimáticos, nitrogenasa y cadena respiratoria por una reserva común de poder reductor.

Las proteínas como ferredoxina o flavodoxina, donadores de electrones a la N_2asa, son también fácilmente oxidables, generando radicales libres. Esta oxidación podría relacionarse con la inhibición reversible.

Separación espacial de la nitrogenasa: en células especializadas como los **heterocistos** en cianobacterias o las **vesículas** en *Frankia*, la separación de la actividad nitrogenasa puede ser temporal o espacial. En cianobacterias sin heterocistos los procesos son secuenciales: durante el día se produce la fotólisis del agua y se genera

ATP y en períodos oscuros se activa la nitrogenasa y la respiración mantiene el nivel de O_2 adecuado. La fijación en especies heterocísticas se puede realizar en el aire.

Barreras a al difusión: los nódulos de leguminosas y actinorrizas ofrecen varios mecanismos de protección que analizaremos en otro capítulo, pero la barrera mecánica de las células de la **corteza del nódulo** limita la entrada de O_2 a la zona bacteriana. **Sistemas membranosos** internos de muchos diazotrofos, del tipo de los mesosomas, limitan la llegada del oxígeno a la enzima.

Regulación de la nitrogenasa

La figura 2 esquematiza los mecanismos de regulación de la FBN. El nitrógeno combinado suprime la fijación por inhibición de la síntesis de la nitrogenasa, mediante mecanismos de represión de la expresión de los genes responsables de la síntesis de los componentes de la enzima (genes nif). En *Klebsiella pneumoniae* la represión ha sido estudiada en detalle y la molécula crucial es una enzima, la **glutamino sintetasa**, que cataliza el primer paso en la síntesis de aminoácidos: el amonio reacciona con el glutamato formando otro aminoácido: **la glutamina.**

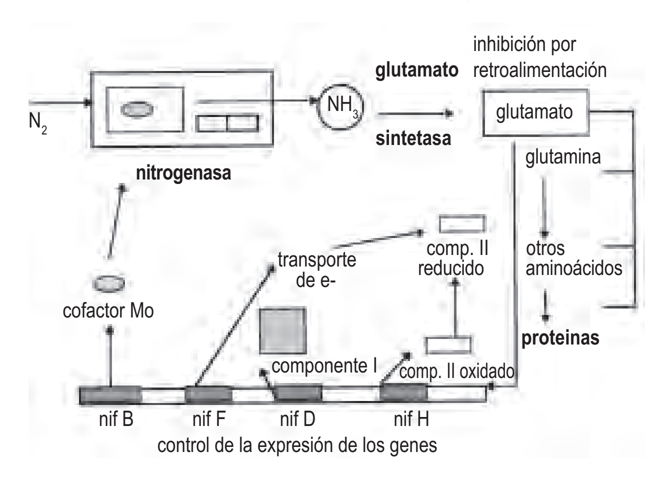


Figura 2- Esquema del control de la nitrogenasa

La mayoría de los otros aminoácidos se forman por transferencia del nitrógeno desde la glutamina a otros compuestos.

La **glutamino sintetasa** es regulada por inhibición *feed back* o retroalimentación, por distintos productos finales de la síntesis de aminoácidos. Alta concentración de glutamina o de algún otro aminoácido disminuye la actividad de la enzima y suprime también la producción de aminoácidos adicionales.

Métodos para evaluar la FBN

Crecimiento y morfología

- Si se logra incremento en la biomasa o en el número de organismos inoculados en un medio de cultivo sin nitrógeno combinado, puede afirmarse que el organismo es un diazotrofo. Es necesario confirmar la capacidad fijadora, pues muchos organismos crecen a expensas de pequeñas impurezas de los medios de cultivo, o crecen como contaminantes luego de un pequeño desarrollo de los diazotrofos.

- La presencia de células especializadas en la fijación del N_2, como los **heterocistos** en cianobacterias filamentosas y las **vesículas**, en *Frankia*, es indicio de que el organismo puede fijar N_2.

Contenido de nitrógeno

Se permite desarrollar al microorganismo o sistema simbiótico en un medio sin nitrógeno o con muy poca cantidad. Las medidas de este elemento por técnicas convencionales como la de Kjeldahl (digestión ácida en caliente de la materia orgánica, destilación y titulación del NH_3), permiten detectar fijación si ésta es de cierta magnitud (más del 1% del N inicial). Los errores son altos y la muestra se destruye en el análisis.

Empleo de isótopos del N

- La aplicación del isótopo radioactivo N^{13} es muy limitada por la corta vida media (11 minutos) y su elevado costo. El uso del isótopo estable N^{15} constituye una de las mejores pruebas de la fijación del N_2. Es más sensible que el Kjeldahl (1000X) (Stevenson y Cole, 1999).

Las metodologías empleadas se basan en:

- **uso de $^{15}N_2$ gas**: la muestra se incuba en sistema cerrado con N_2 enriquecido con N^{15} y luego de un período apropiado se convierte todo el N de la muestra en NH_3 por digestión ácida, se destila y se recoge el amonio formado, por ejemplo en ácido bórico. En el momento del análisis

se oxida este amonio a N_2 el que se analiza en espectrómetro de masa, que separa en un campo magnético los distintos isótopos según su masa (30, 29 ,28). El método posee escasa utilidad en condiciones naturales y limitaciones en condiciones controladas.

● **uso de fertilizantes o sustratos enriquecidos con N^{15}**:
I. técnica de la dilución isotópica, se acepta como el más útil para medir la FBN
II. técnica que usa el “valor A” (proporción del N^{15} que la planta toma del fertilizante)

● **evaluación de la diferencia** que existe en la abundancia natural en N^{15} entre la atmósfera y el suelo. Esta técnica exige gran precisión y brinda datos de gran confiabilidad.

Se evalúan los incrementos en la abundancia en N^{15} sobre un valor promedio de **0,364%** que representa la abundancia natural de este isótopo en la atmósfera. Valores superiores en **0,015%** a ese promedio se aceptan como evidencia positiva de fijación. Las técnicas isotópicas constituyen sin duda la herramienta más importante en la evaluación de la fijación en todos los sistemas biológicos, en el laboratorio o en el campo (Barea, 1991).

Determinación de la actividad nitrogenásica

El descubrimiento de que la nitrogenasa puede reducir otros sustratos además del N_2 permitió desarrollar desde 1966 un método analítico rápido y eficaz que emplea **acetileno** que inhibe la reducción del N_2 por la nitrogenasa y es reducido a etileno. Ambos se evalúan en cromatografía en fase gaseosa con columna de resinas como el Porapak, con N_2 como gas transportador y detector de ionización de llama.

Esta técnica es muy usada por su rapidez, sensibilidad y por la estabilidad del producto formado, el C_2H_4, que permite trasladarlo en frascos cerrados tipo antibiótico hacia el laboratorio. La conversión teórica entre moles de acetileno y de N_2 reducidos por el intercambio de electrones es entre 4 y 3/1: $N_2/(C_2H_2)$ no es correcto, ya que la solubilidad en agua es superior para el acetileno, y éste no constituye un sustrato fisiológico.

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- \longrightarrow 2NH_3 + H_2 \qquad C_2H_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow C_2H_4$$

Los resultados se expresan en etileno formado o acetileno reducido sin efectuar extrapolaciones a nitrógeno fijado. El método se usa para comparar gran cantidad de muestras (cepas, suelos, plantas noduladas) pero no hay que olvidar que la prueba más concluyente de capacidad fijadora la constituye la incorporación de átomos de N^{15}.

Los microorganismos fijadores de nitrógeno

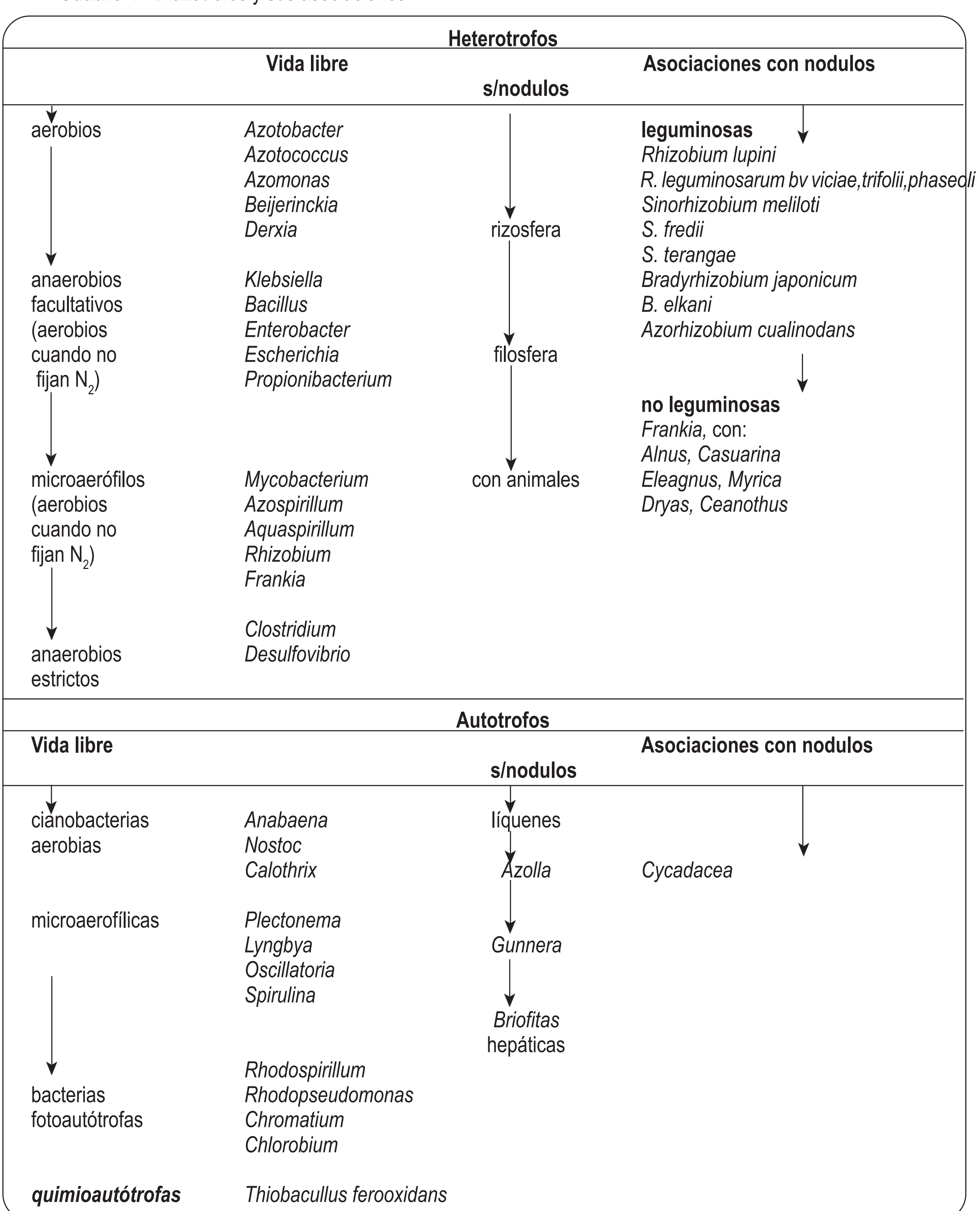
Los diazotrofos: el grupo está integrado como vimos por **protistas inferiores**: bacterias heterótrofas aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas, un representante de bacterias quimioautótrofas y microorganismos fotosintéticos: bacterias y cianobacterias.

El cuadro 4 presenta a los microorganismos fijadores y sus asociaciones con vegetales y animales, en combinaciones simbióticas, nodulares y no nodulares y en asociaciones más laxas y menos obligatorias, como son las asociaciones rizosféricas, espermatosféricas y filosféricas, en donde los organismos sobre todo heterótrofos se ven estimulados por la provisión de compuestos carbonados por parte del vegetal.

Se analizarán los grupos más importantes de diazotrofos, comenzando por aquellos reconocidos como fijadores en vida libre, es decir los que expresan su nitrogenasa sin requerir la protección o la colaboración de otro organismo, aunque pueden ser favorecidos por los nutrientes y el ambiente con baja pO_2 que le ofrece la rizosfera.

Ningún **eucariota** posee esta importante capacidad y los intentos de la ingeniería genética tratando de transferir esta propiedad cuando los genes **nif** se encuentran en plásmidos o están integrados al cromosoma bacteriano, son numerosos y se han logrado algunos **diazotrofos sintéticos**. Numerosos experimentos intentan transferir esta propiedad a vegetales, sobre todo a gramíneas, pero el funcionamiento de estas **plantas transgénicas** en la naturaleza, es motivo de controversia.

Cuadro 4 - Diazotrofos y sus asociaciones



Diazotrofos en vida libre

Por sus relaciones con el O_2 los diazotrofos son (cuadro 4):

- **aerobios estrictas**, como la familia *Azotobacteriaceae*
- **anaerobios facultativos**, como los géneros *Bacillus, Klebsiella, Enterobacter*
- **microaerofílicos** como *Azospirillum, Thiobacillus, Mycobacterium, Acetobacter.* Estos dos últimos grupos se comportan como aerobios cuando crecen con N combinado
- **anaerobios estrictos,** que no crecen ni fijan en aerobiosis, con representantes de los géneros *Clostridium, Desulfovibrio, Desulfotomaculum* y productores de metano.

La mayoría de las bacterias son heterótrofas, sólo ha sido descrito *Thiobacillus ferrooxidans*, como fijador de N_2, quimioautótrofo que crece en condiciones muy ácidas. El resto de los diazotrofos son bacterias fotosintéticas, con representantes de las cianobacterias y de bacterias sulfurosas y no sulfurosas anaerobias.

Diazotrofos fotosintéticos

Bacterias fotosintéticas anaerobias

Se ha determinado capacidad de reducción del CO_2 y del N_2 en muchos representantes de este grupo de procariotas anaerobios, la mayoría en ambientes acuáticos o barros y sedimentos ricos en sulfuros. Pertenecen al orden *Rhodospirillales* (capítulo 3) y pueden realizar metabolismo fotolito o fotoorganotrofo. Las bacterias purpúreas no sulfurosas (*Rhodospirillaceae)* fotoasimilan sustancias orgánicas simples, muchas son incapaces de crecer con sulfuros como único donador de electrones, y si lo emplean no se acumula S^o en la célula. *Rhodospirillum rubrum* es una especie en la que se efectuaron numerosos estudios sobre su nitrogenasa (figura 3).

Las bacterias sulfurosas purpúreas (*Chromatiaceae*) y las sulfurosas verdes (*Chlorobiaceae*) crecen con $S^=$ o S^o como únicos donadores externos de electrones. El S^o en la célula puede ser luego oxidado a sulfatos. La fotosíntesis de estos organismos es anoxigénica (no liberan O_2) y la fijación del N_2 se realiza en anaerobiosis a la luz.

Pueden desarrollarse en la oscuridad heterotróficamente, pero entonces son incapaces de fijar N_2. Aunque no han sido estudiadas todas las especies de bacterias fotosintéticas por su capacidad de fijar nitrógeno, existe consenso de que la mayoría de ellas están dotadas de esta capacidad.

Pocas referencias se encuentran sobre su rol en ecosistemas agrícolas, en parte porque muchos trabajos evalúan la fijación en suelos y aguas sin detallar las especies responsables. Es reconocido que las bacterias fotosintéticas contribuyen a la depuración de suelos y aguas al consumir los sulfuros y aminas que perjudican a los cultivos, liberando además uracilo y prolina, empleados por muchos cultivos, entre ellos el arroz.

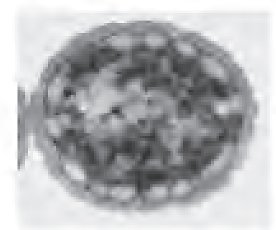



Figura 3- Bacterias fotosintéticas: izquierda: *Rhodospirillum,* derecha: *Chlorobium*

Cianobacterias

Este grupo posee todas las características subcelulares de los procariotas, excepto el tipo de fotosíntesis, que es la de las algas y vegetales. Son capaces de desarrollarse en medio mineral y obtienen su C y N de la fijación fotosintética del CO_2 y N_2. Con la obtención de cultivos libres de contaminantes bacterianos (muchas veces los responsables de la fijación) por radiación U.V. o agregado de antibióticos o colorantes en los medios de cultivo, el número de especies fijadoras se incrementó rápidamente: de aproximadamente 165 géneros, en 8 familias y 3 órdenes, se encontró fijación en 46 géneros, de 7 familias y 3 subórdenes (cuadro 5).

Las cianobacterias presentan tres tipos de células: **vegetativas, esporas o acinetos y heterocistos**. Una célula vegetativa puede diferenciarse en esporas y heterocistos y todas poseen la información genética para la síntesis de la nitrogenasa, que como vimos es muy sensible al O_2.

Los **heterocistos** son células rodeadas de gruesas paredes y parecen vacías al microscopio de luz. Son en general de mayor tamaño que las células vegetativas y están ubicadas a intervalos a lo largo del filamento o pueden presentarse terminalmente. Presentan sistemas membranosos muy desarrollados con invaginaciones. Poseen abundantes ribosomas y han perdido los gránulos estructurales de glicógeno y polifosfato. Están conectados a células adyacentes por un poro en la pared celular (figura 4).

Cuadro 5 - Fijación de nitrógeno en cianobacterias

Suborden	Familia	Género
Chroococcales	*Chroococcaceae*	*Gleocapsa (1)* *Unicelulares*
Nostocales	*Nostocaceae* *Oscillatoriaceae*	*Trichodesmiun (1)* *Oscillatoria (1)* *Plectonema (1)* *Lynbgbya (1)* *Phormidium (1)* *Filamentosas sin heterosistos*
	Nostocaceae	*Anabaena (12)* *Anabaenopsis (1)* *Aulosira (1)* *Cylindrospermun (4)* *Nostoc (8)* *Nodularia (1)* *Filamentosas con heterosistos*
	Rivulariaceae *Scytonemataceae*	*Calothrix (5)* *Scytonema (2)* *Tolypothrix*
Stigonematales	*Stigonemataceae*	*Fischerella (2)* *Hapalosiphon (1)* *Stigonema (1)* *Westielipsis (1)*
	Mastigociadaceae	*Mastigociadus (1)*



Figura 4 - Cianobacterias filamentosas heterocisticas

Según algunos autores se originan en células preexistentes llamadas preheterocistos ubicadas a intervalos regulares del filamento, de tamaño algo mayor que el resto de la célula y según las condiciones ambientales pueden formarse los heterocistos. Otros autores opinan que la posición de ellos está determinada por los ya preexistentes, originándose nuevos cuando algunas sustancias, como el amonio fijado en los heterocistos, alcanzan niveles muy bajos. Su desarrollo es inhibido por niveles elevados de nitrógeno combinado.

Fijación en relación al O_2

Aerobiosis: las cianobacterias filamentosas heterocísticas *(Anabaena, Nostoc)* pueden fijar N_2 en estas condiciones ya que los heterocistos poseen activo fotosistema I, pueden fotofosforilar, pero no liberan O_2 ni reducen el CO_2. Poseen alta actividad reductora, recibiendo los compuestos carbonados, el ATP y el poder reductor de células adyacentes a las cuales les brindan el nitrógeno combinado resultante de la fijación. El sistema membranoso ofrece una protección estructural subcelular y la fotorrespiración activa remueve excesos de O_2 (protección fisiológica).

Microaerofilia, las cianobacterias filamentosas sin heterocistos como *Plectonema* pueden fijar N_2, pero no en condiciones de intensa oxigenación. Lo mismo ocurre

en las unicelulares, como *Gloecapsa*, aunque éstas pueden fijar N_2 en el aire, existiendo una separación temporal entre la liberación fotosintética del O_2 y la actividad nitrogenásica.

Anaerobiosis es posible que tanto los heterocistos como las células vegetativas fijen N_2. Las cianobacterias fijadoras liberan al medio una fracción del nitrógeno fijado, como amonio, amidas, péptidos, polipéptidos, que pueden representar un 20-30% del nitrógeno fijado.

Las cianobacterias son responsables del nitrógeno fijado en **áreas marinas,** en mayor medida por las heterocísticas. Las que no poseen estas células especializadas fijan N_2 en zonas de bajo nivel de O_2, aguas estancadas y eutrofizadas, de importancia en algunos ecosistemas.

Asociaciones con cianobacterias

Estos diazotrofos fotosintéticos se asocian con hongos, hepáticas, helechos, gimnospermas y angiospermas. Lo hacen con los representantes más primitivos entre los vegetales, mientras que *Rhizobium y Frankia* lo hacen con vegetales superiores: angiospermas dicotiledóneas.

Azolla-Anabaena

Muy estudiada es la simbiosis *Azolla-Anabaena*. La *Azolla* es un diminuto helecho de agua que se desarrolla en zonas tropicales en donde llega a cubrir enormes extensiones de arrozales inundados. Mide sólo 2-3 mm de ancho y alberga a una cianobacteria del género *Anabaena* en poros ventrales de los lóbulos de las hojas, muy rica en heterocistos. La planta le ofrece una protección adicional frente al O_2 liberado en la fotosíntesis propia y la de la planta. La cianobacteria no crece bien fuera del huésped.

Esta asociación ha sido empleada desde la antigüedad como biofertilizante **(azollización)** en cultivos anegados, como el arroz. En épocas secas el helecho es mineralizado y el nitrógeno fijado se incorpora al suelo (Silver, Schröder, 1984).

Líquenes

De las 17.000 especies conocidas, aproximadamente un 8% posee una cianobacteria fijadora: (*Peltigera canina, Peltigera aphtosa)*. Son muy estudiados por su contribución en nitrógeno en suelos muy fríos y en bosques tropicales, donde especies de *Stricta, Leptogium y Collema* pueden contribuir con 1 a 8 kg N/ha/año.

Las cianobacterias filamentosas asociadas cambian su forma filamentosa simple por la de filamentos altamente contorneados, las células vegetativas se redondean y se dividen escasamente. Los heterocistos aumentan de un 3-5% al 20-60% en asociaciones con prototrofos, mientras que en asociaciones con heterótrofos, la frecuencia permanece baja.

Otras asociaciones

En zona tropical se describe una asociación con una gimnosperma, la *Cycadaceae,* donde especies de *Nostoc* forman estructuras parecidas a nódulos en las raíces. Aproximadamente un tercio de las 90 especies poseen estos nódulos, con aportes de unos 19 kg N/ha/año en *Macrozamia riedlei*. Entre las angiospermas sólo se conoce un representante subtropical, *Gunnera,* que se asocia a *Nostoc* con heterocistos y que fija N_2 en glándulas de la base de las hojas. El nitrógeno fijado es rápidamente transferido al eucariote, sobre todo como amonio.

Bacterias heterótrofas

El cuadro 4 presenta los más importantes géneros de bacterias heterótrofas fijadoras de nitrógeno. El grupo contiene organismos acuáticos o terrestres de organismos aerobios, anaerobios y anaerobios facultativos. Las especies facultativas sólo fijan N_2 anaeróbicamente y los aerobios presentan varios grados de sensibilidad frente al oxígeno.

Su distribución es muy variada, aunque sólo alcanzan altas densidades cuando se reúnen ciertas condiciones, sobre todo sustratos carbonados, temperatura, pH, humedad.

Los géneros más conocidos desde hace más de 50 años son *Azotobacter y Clostridium*, aerobio el primero y anaerobio el último. Actualmente son muchos los géneros reconocidos como activos en el suelo y en la rizosfera.

Aerobios

Azotobacteriaceae

Es una familia curiosamente integrada exclusivamente con diazotrofos. Ya en 1901, el microbiólogo holandés Beijerinck describió al *Azotobacter chroococcum*, luego que Winogradsky, de la escuela rusa, describiera al anaerobio *Clostridium pasteurianum.* Los integrantes de esta familia se presentan con células grandes, predominantemente bacilos romos u ovales, pero cambian su morfología con el tiempo o las condiciones de desarrollo. En la figura 5 (Gonzalez-Lopez, Lluch-Plá, 1992) se aprecian las formas bacilares y la formación de estructuras de resistencia, menos resistentes que las endosporas bacterianas, llamadas **cistos.**

Las células se presentan frecuentemente en pares, son Gram negativas, aunque pueden aparecer como Gram variables, aerobios estrictos, pero pueden crecer y fijar N_2 bajo presión reducida de O_2. Son móviles por flagelos peritricos o polares, o inmóviles. Los géneros son:

I. Células grandes, ovoides, la mayoría de las especies producen sustancia viscosa extracelular, desarrollo rápido, catalasa positiva:

- **a.** forman cistos, (G + C)% 63-66: *Azotobacter*
- **b.** no forman cistos, (G + C)% 53-59: *Azomonas*

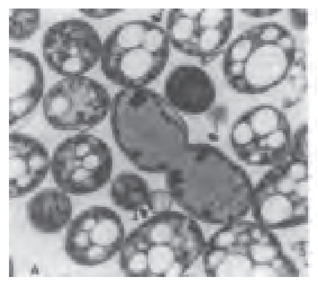
II. Pequeños bacilos, producen mucha viscosidad extracelular y cuerpos lipídicos globulares internos. Desarrollo lento, pueden o no producir catalasa:

- **a.** cuerpos lipídicos bipolares, (G + C)% 5-59, catalasa positiva: *Beijerinckia*
- **b.** numerosos cuerpos lipídicos, (G + C)% 70, catalasa negativa: *Derxia*

Como vimos, los **cistos** son estructuras características de algunas especies y constituyen formas de resistencia a desecación, radiaciones gamma, U.V. Responden rápidamente al agregado de sustancias energéticas, sustratos de las células vegetativas, reflejando mayor permeabilidad que las paredes de las células vegetativas. El microscopio electrónico reconoce dos capas en los citos: la **exina y la intina**. La **exina** contiene un complejo lipídico con lipoproteínas y lipopolisacáridos, con calcio como principal componente mineral. La **intina** posee más carbohidratos y lípidos, pero menos proteínas, con alto nivel en calcio. Además de los cambios morfológicos, en los cistos se acumula ácido poli-β OH-butírico (**PHB**). Parte de esta sustancia se emplea en la síntesis de los componentes del saco del cisto.

Estas estructuras, de muy baja actividad metabólica, permiten ventaja ecológica a los azotobacter en el suelo. En medio favorable, la germinación y crecimiento activo ocurren rápidamente.

Otros cambios morfológicos son la aparición de células grandes, que recuerdan a levaduras, o de grandes bacilos en *A. paspali* a las pocas horas de cultivo. La formación de conglomerados de células cocoides, rodeadas de espeso mucílago, que recuerdan a tétradas, son comunes en *A. macrocytogenes*



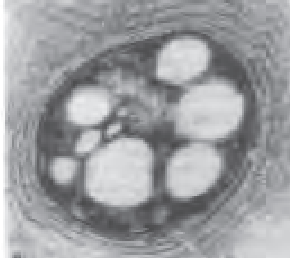


Figura 5- Características morfológicas de *Azotobacter vinelandii* Izquierda: estados morfológicos típicos: células vegetativas, células precísticas ricas en poli-β- OH butirato y células filtrables. B) cisto maduro, con las cubiertas intina y exina (A x 12.500, B x50.000).

.

Otras características

La formación de depósitos intracelulares de lípidos (**PHB**) es característica del grupo, sobre todo en cultivos viejos. En *Beijerinckia indica* se presentan dos glóbulos por célula, polares, pudiendo alcanzar en cultivos viejos más del 50% del volumen celular.

Materiales mucosos extracelulares son también característicos de ciertas especies, incluyen azúcares y ácidos urónicos. Muchas veces su excesiva acumulación en *Bei-*

jerinckia y Derxia, limita seriamente la movilidad de los cultivos y vuelve a los medios líquidos muy viscosos.

Entre los azotobacter, es el grupo de los chroococcum-beijerincki y vinelandii, el que produce abundante muscílago, mientras que el grupo de los agilis e insignis, habitantes sobre todo de aguas, no los forman. Representarían productos celulares de desecho, o bien materiales de reserva en C y energía, y les permitiría protegerse frente a la fagocitosis por protozoos. La nitrogenasa es además protegida del efecto inhibidor del O_2.

Los pigmentos son otra característica de esta familia y su producción, color y solubilidad tienen carácter taxonómico. En *A. chroococcum* es característico el pigmento marrón oscuro (**melaninas**) producido en cultivos viejos por oxidación de la tirosina.

Compuestos empleados en el metabolismo

Muchos compuestos carbonados se emplean por este grupo: azúcares, polisacáridos, alcoholes primarios y secundarios, polialcoholes, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos (ácido benzoico y fenoles), como fuente de carbono, donadores de electrones y de energía para el crecimiento y la fijación del N_2. La vía principal de degradación de los azúcares es la de Enter-Doudoroff y los principales productos formados son piruvato y gliceraldehido- 3- fosfato. Las reservas intracelulares de lípidos (**PHB**) ejercen también efecto en la fijación, demostrado por la movilización de esta reserva en cultivos en fase estacionaria, con escasa cantidad de glucosa.

La exigencia de un alto nivel de materiales carbonados sería uno de los principales factores limitantes del desarrollo de estos diazotrofos en suelos agrícolas

Mecanismos de protección de la nitrogenasa

Los integrantes de esta familia presentan numerosos mecanismos de protección de la nitrogenasa que le permiten fijar N_2 en aerobiosis:

- **Activa respiración**: remueve el oxígeno de las vecindades de la nitrogenasa. La tasa de respiración puede incrementarse de 10 a 50 veces y *A. chroococcum* consume muchos hidratos de carbono en la fijación del N_2 (eficiencia baja, de 10-15 mg N_2 fijado/g azúcar). Para obtener activa respiración, los organismos deben producir grandes cantidades de poder reductor, particularmente NADH, que debe ser oxidado vía sistema citocromo. Se evita la producción de gran cantidad de ATP, en exceso frente a los requerimientos celulares, porque utiliza una **respiración de baja eficiencia**, produciendo aproximadamente 1/3 del ATP por unidad de sustrato.

- **Protección conformacional**: la nitrogenasa se asocia en las células a otras proteínas en caso de intensa oxigenación, protegiendo sus sitios activos. En este estado la enzima no funciona (estado inactivo), pero una vez que se restablecen las condiciones de oxigenación apropiadas, la fijación se renueva rápidamente.

- **Otros mecanismos:** la producción de polisacáridos extracelulares ofrecería una barrera física a la difusión del O_2, el gran tamaño de las células puede contribuir a que la relación entre superficie y contenido celular sea baja, impidiendo activa difusión del O_2, la presencia de membranas intracelulares ha sido descripta como otra eficiente forma de protección de la nitrogenasa. Los azotobacter presentan sistemas membranosos altamente contorneados.

Otros organismos fijadores de N_2 aerobios incluyen especies con poca significancia en los suelos, las cuales por no poseer mecanismo de protección de la nitrogenasa eficientes, sólo fijan en microaerofilia. *Mycobacterium flavum* y otras micobacterias han sido descriptas como fijadoras de nitrógeno. Como ya citamos, pertenece a esta categoría el quimioautótrofo *Thiobacilus ferrooxidans* y algunas bacterias oxidantes del metano.

Microaerofílicos

Azospirillaceae

Constituye un importante grupo de organismos aerobios que se comportan como microaerofílicos cuando fijan N_2. Fueron descriptos por Beijerinck desde 1922, pero recibieron poca atención hasta 1976 cuando Döbereiner y Day los aislaron de raíces de pasturas tropicales, en Brasil. *Azospirillum* es Gram negativo, con forma de vibrio o espirilo, de 1 μm de diámetro, con flagelos peritricos de cor-

ta longitud de onda empleados para desplazarse en superficies sólidas o un flagelo polar, para nadar.

Depósitos de **PHB** pueden deformar las células. Se desarrollan tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (con aporte de nitratos y una fuente de C orgánico). Son preferencialmente **microaerofílicos** en presencia o ausencia de N-combinado en el medio.

No poseen ningún mecanismo de protección de la nitrogenasa frente al oxígeno

El crecimiento es rápido con amonio y O_2 y más lento con N_2 (5-7 horas de tiempo de generación). Sin N combinado el desarrollo es rápido en **medio semisólido**, formando una densa película debajo de la superficie, donde encuentran la tensión de O_2 apropiada. A medida que la demanda de O_2 se incrementa la película se desplaza hacia la superficie. Esta sensibilidad al O_2 hizo que por mucho tiempo no fueran descriptos como activos fijadores.

En medio con malato y extracto de levadura o cloruro de amonio, desarrollan colonias blancas o rosadas, pequeñas y secas, elevadas, circulares o irregulares.

Se han descripto 5 especies: *A. brasilense, A. lipoferum, A. amanzonense, A. halopreferans y A. irakens* y su número se incrementa (Gillis y Reinhold-Hurek, 1994).

Algunos azospirilos son **desnitrificantes,** reduciendo los nitratos a nitritos (**nr$^+$**) y hasta productos gaseosos, N_2 y N_2O (**nir$^+$ y nir$^-$**) (Döbereiner, Pedrosa, 1987). En cereales de clima templado parecen predominar cepas **nir$^-$,** indicando ventajas evolutivas que favorecen a la planta, eliminando una causa de pérdida del nitrógeno fijado.

Estos organismos son considerados responsables de la estimulación del crecimiento en importantes cultivos y pasturas naturales (capítulo 15)(Okon, 1994). La figura 6 muestra la morfología típica de estos organismos (Gonzalez-Lopez, Lluch-Plá, 1992).

Acetobacter

Acetobacter diazotrophicus una nueva bacteria Gram negativa fijadora de N_2 fue aislada en caña de azúcar en medio semisólido, sin N combinado, empleado para detectar *Azospirillum*. Las bacterias se ubican en el gradiente de oxígeno creado entre la superficie y el fondo del tubo en el nivel adecuado para su metabolismo aerobio y para la protección de la nitrogenasa.

Esta bacteria es capaz de crecer y fijar N_2 en pH ácido y en presencia de altas concentraciones de azúcar: glucosa y sacarosa pero no de gluconato. No posee nitrato reductasa y puede fijar N_2 incluso con niveles de 10mM de nitrato. Aislada de caña de azúcar, en Brasil, fue luego encontrada en otros países a partir de tallos, hojas, raíces y en la savia del xilema de diferentes cultivos (sorgo, batata dulce). Su crecimiento óptimo a pH 5,5 y 10% de azúcar, condiciones prevalentes en el caldo de caña, evidencia su adaptación a la planta. Recuentos de 10^3-10^5 bacterias.g^{-1} han sido informados en la rizosfera de caña de azúcar Como no ha sido aislada del suelo, se piensa en una bacteria endofítica, de gran interés ya que el nitrógeno sería fijado dentro de la planta. Se ha determinado de que *A. diazotrophicus* produce ácido indol-acético, promotor del crecimiento vegetal y puede excretar amonio, hasta un 40% del fijado, lo que explicaría los altos niveles de fijación en caña de azúcar.

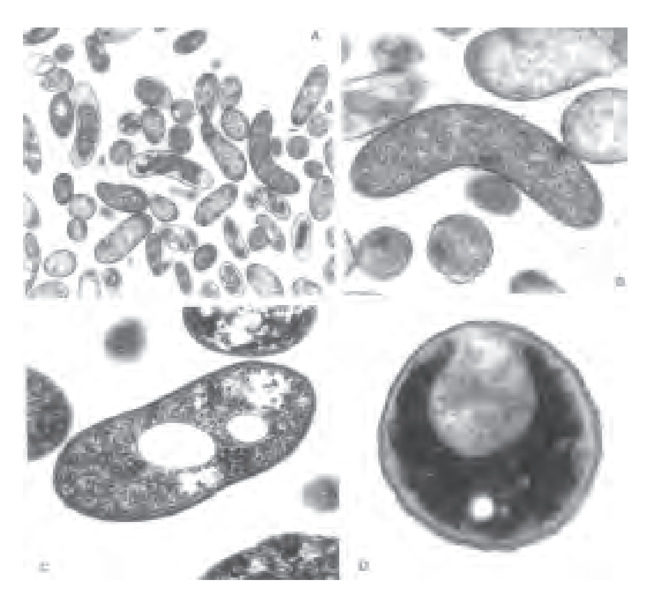


Figura 6- Morfología de *Azospirillum brasilense*
A) en medio con malato a las 48h, clara morfología encurvada y ausencia de corpúsculos de inclusión (x 8.000). B) microfotografía de la anterior (x 25.000).C) 48h en medio con fructosa, con mayor pleomorfismo y gránulos de PHB (x 45.000) y D) a los 7 días en el mismo medio, típica forma C, con cubiertas multilaminares (x 50.000)

Bacterias anaerobias facultativas

Con nitrógeno combinado, este grupo puede crecer con o sin O_2, pero sólo pueden fijar N_2 anaeróbicamente, por lo que resultó difícil establecer su contribución en suelos y aguas. El grupo comprende bacterias pertenecientes a las *Enterobacteriaceae* y al género *Bacillus*. Entre las primeras ha sido muy estudiada *Klebsiella pneumoniae*, conocida antes como *Aerobacter aerogenes*, en la cual se han realizado experiencias de transferencia de genes fijadores. Pertenece a las bacterias "coliformes" por su parecido a *Escherichia coli*, habitante del intestino del hombre y animales.

Bacillus polymyxa, Bacillus macerans y Bacillus pasteurianum son especies muy conocidas entre los diazotrofos. Son bacilos Gram positivos, esporulados, aerobios, que fijan en microaerofilia, de la familia *Bacillaceae*, cuyos representantes anaerobios fijadores pertenecen al género *Clostridium*. Las bacterias propiónicas citadas en el cuadro 4, se encuentran en leches fermentadas y han sido descriptas como fijadores de N_2 en anaerobiosis.

Bacterias anaerobias

Clostridium pasteurianum fue el primer diazotrofo descrito por Winogradsky en 1893. Otras especies de este género pueden también fijar nitrógeno y son habitantes de suelos, abonos en fermentación, rumen, *compost*. Una pasteurización previa de la muestra de suelo y otros materiales (10' a 80ºC) facilita el aislamiento al eliminar las formas no esporuladas. No pueden emplear el O_2 bajo ninguna circunstancia.

Otros diazotrofos anaerobios son **bacterias sulfatorreductoras,** que usan sulfatos como aceptores de electrones finales en la respiración anaerobia. Frecuentemente se libera ácido sulfhídrico (H_2S), volátil, de olor desagradable. Los géneros conocidos son *Desulfovibrio y Desulfotomaculum*. Entre los primeros, varias especies pueden fijar N_2; algunas tienen importancia en el mar, fijando N_2 en sedimentos. El segundo género posee menos representantes diazotrofos.

Las **bacterias productoras de metano** son anaerobias estrictas y son abundantes en ambientes en fermentación y en el fondo de estanques. La cepa en la que se detectó fijación, resultó ser una población mixta.

Rhizobios

Son bacilos Gram negativos, de 0,5 a 0,9 micras por 1,2 a 3,0 micras, aislados o de a pares, generalmente móviles cuando jóvenes por flagelos peritricos, polares o subpolares. No forman endosporas, pero sus células contienen gránulos de ácido poli- β- hidroxibutírico (**PHB**) que se tiñen de negro con negro Sudán y aparecen refráctiles al microscopio de fase (figura 7,arriba)(Duhoux y Nicole, 2004).

Algunas cepas poseen gránulos metacromáticos de polifosfatos.

La mayoría de las cepas producen abundantes polisacáridos extracelulares mucilaginosos, de composición variable según la cepa y el medio de cultivo, que los protegen de la sequedad. Algunas cepas desarrollan estructuras similares a cápsulas al envejecer, que representarían acumulación extracelular de antígeno de pared.

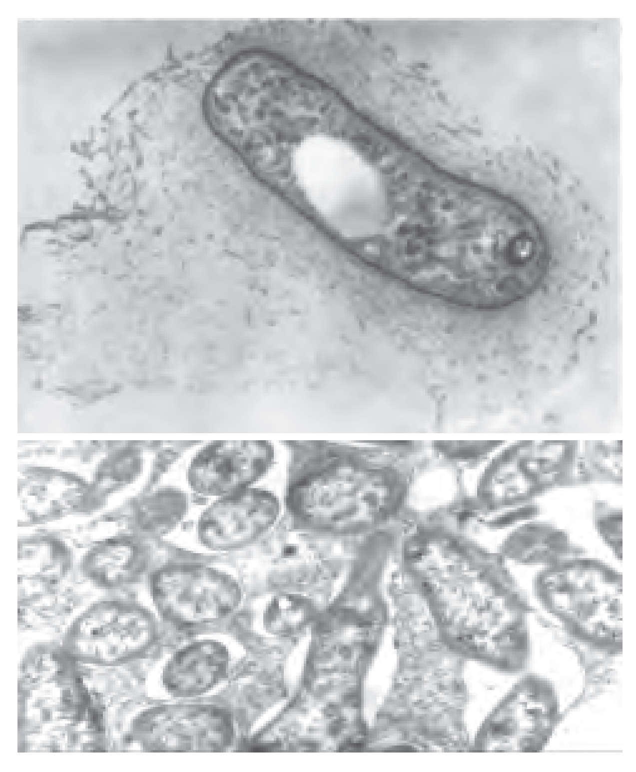


Figura 7- Arriba: Célula de rhizobio mostrando los exopolisacáridos que rodean a la célula e internamente gránulos de ácido poli β-OH-butírico, material carbonado de reserva. Abajo: Bacteroides en tejido central de nódulos de leguminosas incluidos en su membrana peribacteroide

Los rhizobios sufren cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos en las células del nódulo dando lugar a células pleomórficas, de formas muy irregulares, en X, Y, o de clava, denominadas **bacteroides**, que carecen de flagelos y no se dividen (figura 7). Estas formas retoman su morfología y propiedades clásicas (bacilos, no fijadores de N_2), al sembrarse en medio de cultivo.

Se presentan en grupos aislados, encerrados en envolturas membranosas originadas por la planta. Para algunos autores estos cambios constituyen otro ejemplo de **ciclo celular**, que como el que incluye la formación de endosporas bacterianas, originan dentro de un mismo organismo estructuras con propiedades diferentes a las de las células que las originaron. Un conjunto de cambios conducen en medios de cultivo a las formas vegetativas clásicas.

Los rhizobios son organismos aeróbicos, los cuales, sin embargo, son capaces de crecer a una tensión de oxígeno menor de 0,001 atmósfera. No presentan ningún mecanismo de protección de la nitrogenasa frente al O_2.

En base a sus propiedades culturales los rhizobios se diferencian en dos grupos, que dieron lugar a dos géneros:

- **de crecimiento rápido (CR),** con tiempo de generación entre 3 y 4,5 horas, acidifican el medio y liberan abundante cantidad de polisacáridos, género *Rhizobium* (*R.loti, R. leguminosarum*)
- **de crecimiento lento (CL),** con tiempos de generación que oscilan entre 6 y 8 horas, producen menos polisacáridos y alcalinizan el medio: género *Bradyrhizobium: B. japonicum, B. spp*.

El concepto de **"productores de ácidos**" o **"productores de álcalis"** depende de la composición del medio, de la presencia de distintos hidratos de carbono y compuestos nitrogenados orgánicos y no se toma como carácter taxonómico exclusivo.

El aspecto de las colonias depende del medio de cultivo y de la especie. En medio de extracto de levadura-manitol-agar (**EMA**), las cepas de crecimiento rápido originan colonias de 1 a 5 mm luego de 3 a 5 días de incubación, mientras que las de crecimiento lento no exceden, dentro de un período de 10 días, un diámetro de 1 mm. Su forma varía desde plana a convexa, su color puede ser blanco opaco, poco gomosa, a blanco lechosa, translúcidas, con abundante cantidad de polisacáridos.

Aislamiento y medios de cultivo

Los rhizobios son organismos heterótrofos exigentes que se desarrollan en medios ricos, con vitaminas y aminoácidos, aunque existen gran variedad de cepas que difieren en sus requerimientos nutricionales.

A partir de nódulos

Como no presentan mecanismos de protección de la nitrogenasa en vida libre, debe aislarse por siembra de contenido nodular en medios ricos, como el EMA (extracto de levadura-manitol-agar), con agua, sales, manitol como fuente de carbono y energía, extracto de levadura, como fuente de nitrógeno y de factores de crecimiento.

- **Fuentes de carbono:** los rhizobios de crecimiento rápido utilizan una mayor variedad de fuentes carbonadas, siendo la sacarosa y el manitol los sustratos de preferencia. El glicerol y las pentosas (L-arabinosa, xilosa, ribosa) son preferidas por los rhizobios de crecimiento lento. El catabolismo de la glucosa, fructosa, sacarosa, manosa, gluconato y arabinosa fue estudiado en diferentes especies demostrándose en extractos acelulares la presencia de enzimas de las vías de Entner-Doudoroff (ED), de pentosa-fosfato (PF) y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) en especies **CR** y de enzimas de la vía ED y CAT en especies **CL**.

- **Fuentes de nitrógeno**: no son específicas; el nitrato y el amonio pueden ser empleados por la mayoría de las cepas, pero a menudo se obtienen mejores crecimientos con aminoácidos como glutamato y asparato. En los medios de cultivo se usa el extracto de levadura.

- **Fuentes de factores de crecimiento:** muchas especies de rhizobio son estimuladas por factores de crecimiento como biotina, tiamina, riboflavina o pantotenato de calcio. El requerimiento es variable y algunas especies y cepas se desarrollan mejor sin su agregado. El

extracto de levadura provee de fuentes de N-combinado y factores de crecimiento.

- **Minerales:** algunos aniones y cationes son también requeridos para el desarrollo bacteriano, como K^+, Mg^{++}, $PO4^{-3}$, $SO4^{=}$, Cl^-, además de trazas de Co^{++}, Ca^{++} (relacionado con la estructura de la pared).

Medios de cultivo: según la finalidad que se persiga, se emplean los:

- **complejos,** son los más comúnmente usados, sobre todo en la preparación de inoculantes: medio-79 o EMA (extracto de levadura-manitol-agar)

- **definidos**, en los cuales el extracto de levadura es reemplazado por compuestos nitrogenados inorgánicos, aminoácidos y cofactores, se emplean para determinar los requerimientos nutritivos, los productos del catabolismo, las vías metabólicas y la identificación de mutantes.

A partir de suelo (sin leguminosas) (Anexo práctico)

* sembrar la leguminosa específica en el suelo en cuestión (campo, maceta, tubos) y esperar la aparición de nódulos, para proceder como anteriormente

* inocular muestras del suelo en estudio en suspensión con agua en tubos y/o macetas con soporte inerte (arena/vermiculita, agar, etc.) con plántulas creciendo asépticamente (semillas desinfectadas previamente). El medio es para plantas: agua y sales, sin carbono (fotosíntesis) ni nitrógeno (fijación de N_2), ambos elementos son tomados del aire.

Identificación de rhizobios y taxonomía

Rhizobio es un habitante normal del suelo, aunque puede presentarse muchas veces en baja densidad. Es capaz de sobrevivir, compitiendo efectivamente con el resto de la población y haciendo uso eficiente de los nutrientes disponibles. La vida saprofítica de esta bacteria es tema de interés, incluso en cultivos que son año a año inoculados con altas dosis de rhizobios específicos, como ocurre en casi 100% del área sembrada de soja en Argentina, Uruguay y Brasil.

La carencia de **técnicas específicas** y confiables limitó bastante este estudio: en el suelo el rhizobio no se distingue del resto de la población bacteriana, no fija N_2 o lo hace a niveles muy bajos, no posee requerimientos nutritivos específicos, ni morfología característica.

Las técnicas más empleadas en el reconocimiento y seguimiento de esta bacteria en ambientes naturales son: recuentos, serología, empleo de mutantes resistentes a antibióticos, sondas de ADN específicas y aquellas que analizan la composición del ADN o ARN (Anexo práctico). En general, la forma más directa para identificar una cepa de rhizobio es inducir la formación de nódulos, reaislándolo a partir de los mismos. El cuadro 6 presenta alguno de los criterios empleados en la taxonomía de rhizobio.

Cuadro 6- Caracterización fenotípica y filogenética de rhizobio

Caracteres fenotípicos
* Rango de leguminosas hospederas (infectividad, efectividad)
* Rango de sustratos empleados como fuentes de energía (azúcares, alcoholes, hidratos de C complejos)
* Rango de sustratos empleados como fuente de N (aminoácidos, urea, nitratos)
* Resistencia a antibióticos
* Movilidad electroforética de distintas enzimas
* Tolerancia a situaciones de estrés (salinidad, temperatura, pH)

Caracteres filogenéticos
* Modelos de bandeo de fragmentos de restricción del ADN (*RFLPs*)
* Grado de hibridización con sondas específicas del ADN
* Análisis de secuencias del fragmento 16S del rARN

Resumiremos algunos de los caracteres taxonómicos empleados:

- **inefectividad**: capacidad de nodular: especies de leguminosas mutuamente susceptibles de nodular con un tipo particular de rhizobio, constituyeron un grupo de **"inoculación cruzada".** Las cepas capaces de nodu-

lar las plantas de uno de esos grupos se consideraban como especies, independientemente de la ocurrencia de la fijación de N_2. Pero numerosos nódulos son inefectivos, no benefician el crecimiento de la leguminosa y se consideran incluso como **parásitos**, ya que la planta provee energía para su desarrollo, sin recibir nitrógeno en cambio. La biodiversidad de cepas de rhizobios es considerable, como lo demuestran los estudios en árboles (*Prosopis sp., Faidherlia albida*, etc.).

- **efectividad,** (capacidad para fijar N_2), la propiedad más importante en una selección de cepas para preparar un inoculante

- **características morfológicas y culturales,** crecimiento con distintas fuentes de carbono, producción de ácidos, resistencias a salinidad, acidez, antibióticos, etc.

- **análisis del genoma** bacteriano han demostrado ser importantes herramientas en los estudios de evolución y han renovado el interés en estudios taxonómicos. La composición de bases del ADN (citosina+guanina)%, plásmidios, el análisis de las proteínas totales por electroforesis, hibridación de ADN y ARN o ARN-ARN, el polimorfismo de los fragmentos de restricción del ADN *(RFLP), la* secuenciación del ADN y otras aproximaciones como el análisis electrofóretico de enzimas y la taxonomía numérica han demostrado su utilidad en estudios de estas bacterias

- **análisis de ARN 16s ribosomal,** tanto la conservación del ARN ribosomal como la existencia de variabilidad en ciertos segmentos, hace que el estudio de la secuencia de los genes del rARN, constituyen importantes herramientas en la comparación de organismos y en el establecimiento de relaciones filogenéticas

- **análisis serológico,** estos estudios han sido relativamente poco utilizados para clasificar a los rhizobios debido a la variedad de antígenos que poseen estos organismos.

- **análisis de la homología de fragmentos de restricción amplificados por la reacción de la polimerasa *(RFLP/PCR*).** Estas técnicas son muy empleadas y sus resultados acuerdan con la filogenia derivada de estudios de enzimas multilocus (Martínez *et al,* 1996).

La taxonomía numérica ha permitido agrupar enorme cantidad de caracteres bacterianos (morfológicos, metabólicos, ecológicos, genéticos) determinando grados de similitud entre aislamientos.

En el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (2001) se encuentra la descripción de los géneros de la familia *Rhizobiaceae* y el cuadro 7 incluye algunas de las modificaciones recientes.

Cuadro 7 - Clasificación de los rhizobios

Género	Especies	Hospedantes
Bradyrhizobium	*B. japonicum*	*Glycine max*
	B. elkanii	*Glycine max*
	Bradhyrhizobium spp.	*Vigna, Macroptilium Arachis, Acacia*
Rhizobium	*R. leguminosarum*	
	biovar viciae	*Vicia*
	biovar trifolii	*Trifolium*
	biovar phaseoli	*Phaseolus y* leguminosas templadas
	R. lupini	*Lupinus*
	R. galegae	*Galega officinalis*
	R. etli	*Phaseolus vulgaris*
	R. tropici	*P. vulgaris y Leucaena*
Azorhizobium	*A. caulinodans*	*Sesbania rostrata* (aéreos)
Sinorhizobium	*S. meliloti*	*Medicago, Melilotus, Trigonella*
	S. fredii	*Glycine spp., Leucaena leucocephala*
	S. saheli	*Sesbania cannabina, S. rostrata*
	S. terangae	*Acacia, Sesbania*
Mesorhizobium	*M. loti*	*Lotus, Lupinus*
	M. huakuii	*Astragalus sinicus*
	M. ciceri	*Cicer arietinum*
	M. hainanensis	*Leguminosas de regiones áridas*
	M. tianshanense	*Leguminosas de regiones tropicales*
Allorhizobium	*A. undicola*	*Neptunia natans*
Blastobacter	*B. denitrificans*	*Aeschynomene indica*
Methylobacterium	*M. nodulans*	*Crotalaria*
Burkholderia	*B. sp*	*Aspalathus*
Ralstonia	*R. taiwanensis*	*Mimosa*

Frankia

El endofito de nódulos tipo *Alnus* ha sido frecuentemente descrito como simbionte obligado y pocas referencias a ellos se encuentran en los textos clásicos de microbiología. Han sido introducidos en la 8ª edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, pero no figuran muchos textos sobre actinomicetes. La causa principal de esta omisión ha sido la incapacidad de cultivarlos *in-vitro*. Este inconveniente ha sido superado y se han aislado con éxito endofitos de *Comptonia peregrina*, de *Alnus glutinosa*, *Colletia spinosissima* (Diem *et a.l.*, 1982).

Algunos autores presentaron evidencias para la subdivisión de los endofitos tipo *Alnus* basadas en las barreras de inoculación cruzada entre especies vegetales. Las experiencias se realizaron desde 1978 inoculando con cultivos puros de *Frankia* y se comprobó que un mismo aislamiento podía nodular distintas especies, resultando difícil la subdivisión en especies basada en la especificidad endofito-hospedante, como en el caso de los rhizobios.

Otros caracteres que se toman en cuenta para establecer claves taxonómicas en *Frankia* incluyen:

- **la composición química de las paredes celulares**
- **la capacidad para formar esporas en los nódulos**
- **isoenzimas**
- **taxonomía genética**

Frankia posee ciertos rasgos taxonómicos característicos: su pared posee ácido diaminopimélico, ácido glutámico, alanina, peptidoglicano. Sus ácidos grasos son de cadena normal, ramificados y monoinsaturados. Ciertos lípidos no saponificables llamados **hopanoides** les confieren resistencia en condiciones desfavorables, son usados en la taxonomía. También se han encontrado cepas genéticamente diferentes en endofitos de *Alnus*: una produce esporas y la otra no, aunque en cultivo puro esta última es capaz de esporular, indicando que la supresión de la esporulación en simbiosis está controlada por el hospedante.

Así, los intentos de clasificación de *Frankia* (Lechevalier, 1994) incluyen estudios sobre:

i) infectividad y efectividad en distintos hospedantes
ii) crecimiento y características fisiológicas
iii) estudios genéticos: nº y tipo de plásmidos, isoenzimas, perfil de ácidos grasos, polimorfismo de segmentos de restricción del ADN (*RFLP*), secuencias del rARN 16S. Las regiones conservadas de este fragmento permiten ubicar al género *Frankia* dentro de los Actinomicetales, mientras que las regiones hipervariables son útiles para la clasificación filogenética a nivel de género y especie.

Aislamiento

Se han empleado distintas técnicas para lograr el aislamiento de *Frankia*: digestión enzimática de macerados de nódulos, microdisección, fraccionamiento en gradiente de sacarosa, diluciones seriadas o aislamiento directo a partir de trozos de nódulos desinfectados superficialmente. Se han desarrollado numerosos medios de cultivos. Las plántulas se desarrollan en medio sin nitrógeno en tubos, al mes se inoculan con macerado nodular y los nódulos se hacen visibles entre 1 y 2 meses. A partir de ellos se efectúa el aislamiento de *Frankia* (Anexo práctico).

Morfología Esta bacteria presenta distintas estructuras en medios de cultivo (figura 8) y en los nódulos

- **hifas:** en las colonias las hifas aparecen ramificadas, septadas, de unos 0,4 a 0,9 micras
- **los esporangios,** pueden presentarse intercalarmente, con **esporas** de forma irregular: globulosas, o de masa, alargados o irregulares, con paredes gruesas, tamaño variable (0,5 a 1 micra), muy abundantemente empaquetadas en la zona infectada. Su formación puede originarse en las células de la corteza a partir de cuerpos esporógenos de las hifas, o en espacios intercelulares. La formación de esporas puede estar ausente, los nódulos sin ellas se denominan Sp^- y los que las presentan como nódulos Sp^+.
- **vesículas**, la presencia de estas estructuras esféricas (2,6 micras) de paredes gruesas, en extremos de hifas cortas y ramificadas se visualizan en el microscopio óptico y son el asiento de la fijación de nitrógeno (protección de la N_2asa) en aerobiosis

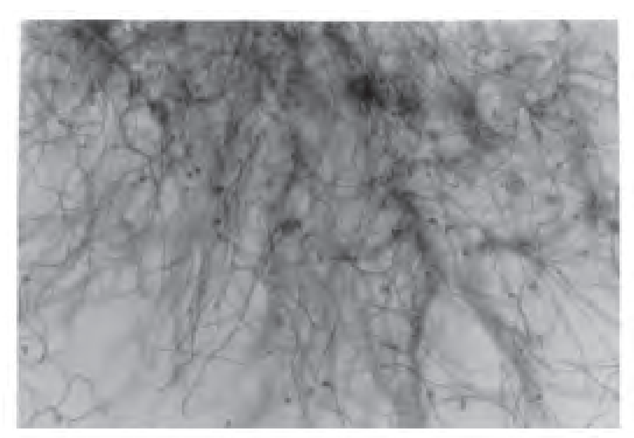




Figura 8 - Morfología de *Frankia* con hifas, esporangios y vesículas. Arriba: aislamiento de *Casuarina equisetifolia* (Frioni *et al*, 1991). Abajo: esporangios, estructuras de resistencia y de producción de esporas y diazovesículas (flechas) (Duhoux y Nicole, 2004).

El polimorfismo de *Frankia* dificulta los estudios fisiológicos y la evaluación del crecimiento, ya que no produce turbidez uniforme como los microorganismos unicelulares. La curva de crecimiento se analiza por determinaciones de **biomasa** por medio de diferentes técnicas, como análisis del contenido de proteínas, determinación de actividad deshidrogenasas (TTC, INT), turbidimetría luego de sonicación de las hifas, actividad N_2asa. Para la preparación de inoculantes y en estudios fisiológicos se trabaja con cultivos frescos, repicados varias veces en medios nuevos.

Fuentes de carbono y nitrógeno

Frankia emplea ácidos grasos de cadena corta (propiónico, acético) y sus derivados, intermediarios del ciclo de Krebs (ácidos succínico, málico) y el ácido pirúvico. Puede crecer con N_2 en vida libre y emplear otras fuentes de N: aminoácidos, urea, nitrato, adenina, uracilo y amonio. Como en otros diazotrofos la glutamino sintetasa es la enzima responsable de la asimilación del amonio.

Protección frente al oxígeno

Las cepas son aerobias o microaerofílicas y a diferencia de los rhizobios, frankia puede fijar N_2 a diferentes concentraciones de O_2 (Valdes *et al,* 1996).Su nitrogenasa está protegida en las **vesículas**, rodeadas de gruesas capas lipídicas, integrados por hopanoides y triterpenos pentaciclados, reconocidos en la alteración de la permeabilidad de membranas en procariotes. Estas estructuras se han comparado con los heterocistos de las cianobacterias. La presencia de **superóxido dismutasa** en el nódulo contribuiría también a la protección. Los **gruesos tejidos** del nódulo y la **hemoglobina** contribuyen a la protección en simbiosis. La presencia de una **hidrogenasa funcional** ha sido citada como un mecanismo adicional y permitiría en muchos casos un crecimiento autotrófico

Genética de *Frankia*

Los estudios han avanzado lentamente por la baja velocidad de crecimiento, la escasa germinación de las esporas. Mucha de la información obtenida se ha logrado con las técnicas usadas para los rhizobios y actinomicetes. Se ha avanzado en la determinación de los plásmidos y los genes *nod, nif* y genes que codifican la asimilación del amonio. Una herramienta muy útil en el establecimiento de relaciones filogenéticas es el estudio de las secuencias conservadas en los segmentos 16S de los rARN.

Los diazotrofos asociados a los vegetales en relaciones no simbióticas (rizosféricas, filosféricas) y simbióticas nodulares, son analizados en el capítulo 15.

Eficiencia de la fijación del N_2 por diazotrofos

→

vida libre	asociaciones rizosféricas	asociaciones nodulares

Causas:

- aportes constantes de nutrientes
- concentración de O_2 bajas
- exportación productos de la fijación (inhiben a la FBN)

Bibliografía

Barea, J. M. Cuantificación de la fijación biológica de N mediante el uso de N [15] . En: **Fijación y movilización de nutrientes,** vol II, 1991, Olivares y Barea, coordinadores. CSIC, Colección Nuevas Tendencias, Madrid

Diem, H. G.; D. Gauthier y Y. Dommergues, Isolation of *Frankia* from Nodules of *Casuarina equisetifolia*, 1982, Can. J. Microb., 28 (5), 526-530.

Döbereiner, J. y F. P. Pedrosa, **Nitrogen-fixing Bacteria in Non-Legumes Cops Plants**. 1987, Springer-Berlag, Berlín

Duhoux, E. y Nicole, M. **Biologie Végétale, Associations et interactions chez les plantes**, 2003 IRD, Dunod, París

Frioni, L. **Procesos microbianos**. 1999, Fundación de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

Frioni, L.; Spinelli, A. y Maggi, A. Nodulación y fijación de nitrógeno en *Casuarina y Allocasuarina* cultivadas en el país. 1991, Bol. Inv. Fac. Agronomía (Montevideo), Nº 30: 1-20

Gillis, M, y B. Reinhold-Hurek Taxonomy of *Azospirillum,* en: ***Azospirillum*-Plant Associations**. 1994 Y.Okon (ed), CRC Press, Boca Raton, Florida

Gonzalez-Lopez, J. Y Lluch Plá, C. (eds) **Interacción Planta-Microorganismo**, 1992, Biología del Nitrógeno, Editorial Rueda, Madrid

Lechevalier, M.P. Taxonomy of the genus *Frankia.* 1994, Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 1-8

Martinez, E., D. Romero y J. Caballero-Mellado, *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. 1996, Crit. Rev. Plant Sci. 15(2):113-140

Okon, Y. (ed) ***Azospirillum*-Plant Associations**. 1994, CRS Press, Boca Raton, Florida

Silver, W. S. y E.C. Schröder, **Practical application of *Azolla* for rice production**. 1984, Martinus Nijhoff, J. Publish, Boston

Stevenson, F. J. & Cole, M. A. **Cycles of Soil**, 1999, Wiley & sons, New York

Valdes, M., J. Vazques Mendes y A.. Muños García La biología de *Frankia*, endosimbionte de árboles fijadores de nitrógeno. 1996, Ciencia 47:51-67

Zuberer, D. A. Biological Dinitrogen Fixation: Introduction and Nonsymbiotic. En: **Principles and Applications of Soil Microbiology,** 1998, Sylvia, Fuhrmann, Hartel, Zuberer, (eds), Prentice Hall. International, London

Preguntas de repaso

1) ¿Por qué resulta de difícil asimilación el N contenido en el N_2?
2) Organismos diazotrofos. ¿Cómo pondría en evidencia a estos organismos?
3) ¿Cuales se consideran requisitos indispensables para que ocurra la FBN?
4) ¿Puede comparar este proceso con la Fijación Industrial?
5) Si bien los costos de la síntesis química de fertilizantes nitrogenados está bajando, explique los motivos de continuar explotando la FBN.
6) Señale algún método para evidenciar que una pradera natural (leguminosas, gramíneas) está fijando N_2.
7) Compare y explique las variaciones en la eficiencia de la FBN en diazotrofos en vida libre, en asociaciones rizosféricas y en simbiosis nodulares.
8) Compare simbiosis con rhizobio y con frankia.
9) Compare las asociaciones entre diazotrofos fotosintéticos y heterótrofos con los vegetales.
10) ¿Cual es el proceso biológico que contrarresta a la FBN en la naturaleza?

12 Ciclos biológicos del azufre, fósforo, hierro

Ciclo biológico del azufre

El azufre es un elemento esencial para todos los organismos, es uno de los 10 bioelementos requeridos en relativamente alta concentración, e integra la composición de:

- proteínas, en los aminoácidos metionina (21% de S) y cistina (27% de S), formando además puentes de azufre. Los enlaces disulfuro estabilizan la estructura terciaria de proteínas

- factores de crecimiento, como la biotina y tiamina, hormonas, coenzima A

- fuente de energía para muchos microorganismos: la oxidación de formas reducidas del azufre, importantes en ambientes a altas temperaturas, permite la fijación del carbono y el desarrollo microbiano

Los vegetales contienen aproximadamente la misma cantidad de S y de P (0,2-0,5%) de su peso seco y como sus funciones están relacionadas con actividades enzimáticas, como la ferredoxina, una proteína Fe-S, que participa en la fotosíntesis y también en la fijación del N_2, las plantas deficientes en S muestran síntomas característicos de deficiencias: retardo en el crecimiento, amarillamiento de hojas, sobretodo en las leguminosas.

Los principales reservas de azufre se encuentran en la litósfera (rocas sedimentarias, ígneas y metamórficas de la corteza terrestre), con 24 x 10^{18} kg y en la hidrósfera, 1,3 x 10^{18} kg. En el suelo se encuentran cantidades moderadas (2,6 x 10^{14}kg), menos en la atmósfera (4,8 x 10^{9}kg) y en vegetales (7,6 x 10^{12}kg) (Stevenson y Cole, 1999). El cuadro 1 muestra flujos de azufre entre los componentes más importantes en suelos agrícolas típicos.

Cuadro 1- Flujos de azufre en suelos agrícolas (kg/ha/año)

Toma por vegetales	10-50
Remoción por cosechas	5-20
Remoción en productos animales	0-5
Entradas de la atmósfera	2-20
Lavado	0-50
Meteorización de minerales	0-5
Emisiones volátiles	desconocidas

El contenido de S en los suelos varía mucho, los rangos más frecuentes en suelos agrícolas de regiones húmedas y semi-húmedas es de 100 a 500 mg/kg o 0,01 a 0,05% (224-1.120kg/ha en la capa arable), los vegetales consumen una cantidad variable de este elemento, en general se citan datos entre 10-30kg/ha. La mayor reserva de este elemento en el suelo es orgánica y en muchos casos constituye un factor limitante al desarrollo vegetal, que presentan claros síntomas de deficiencia. La respuesta a fertilizantes azufrados es rápida en esos casos. Los fertilizantes fosfatados contienen $CaSO_4$ que elevan el nivel de S del suelo. Los vegetales se nutren de preferencia de sulfatos, pero pueden asimilar también ciertos aminoácidos y formas volátiles de azufre por las hojas.

La atmósfera puede contener compuestos con azufre: SO_2, SH_2, provenientes de la actividad industrial, de la polución en las grandes ciudades y también de una actividad bioló-

gica intensa. La figura 1 presenta las transformaciones biológicas que sufren los compuestos con azufre que incluyen procesos de:

- **mineralización-inmovilización**
- **óxido-reducción**
- **volatilización**, de menor importancia, excepto las pérdidas de H_2S o anhidrídos de azufre, debido a actividades del hombre.

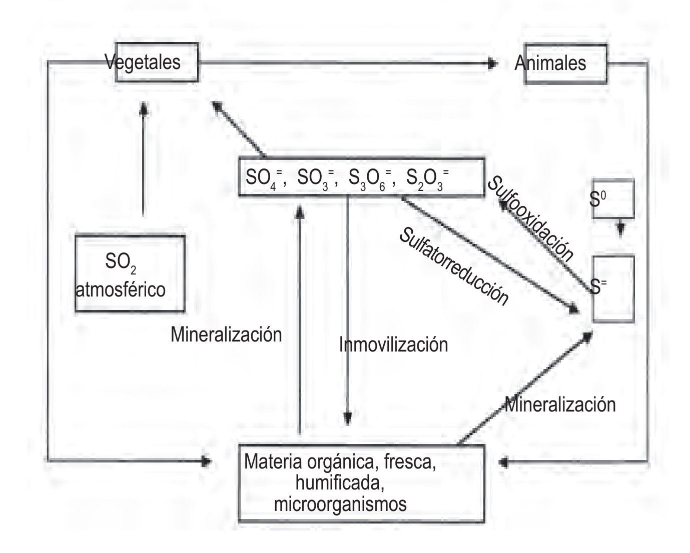


Figura 1- Transformaciones biológicas del azufre

No son importantes las reacciones de precipitación-solubilización de compuestos azufrados.

El azufre existe en varios estados de oxidoreducción, desde -2 en los sulfuros volátiles o precipitados (H_2S, FeS), hasta +6 en los sulfatos (figura 2) (Frenchel *et al,* 1998).

Numerosas son la formas inorgánicas en el ambiente: sulfuros (-2), Sº (0), tiosulfatos (-2, +6), sulfitos (+4), sulfatos (+6). Los estados de oxidación más comunes en suelos y materiales orgánicos son: -2 en sulfuros y en la mayoría de compuestos orgánicos y +6 en los sulfatos y moléculas que los contienen. Los procesos de oxidación y reducción ocurren fácilmente en condiciones adecuadas.

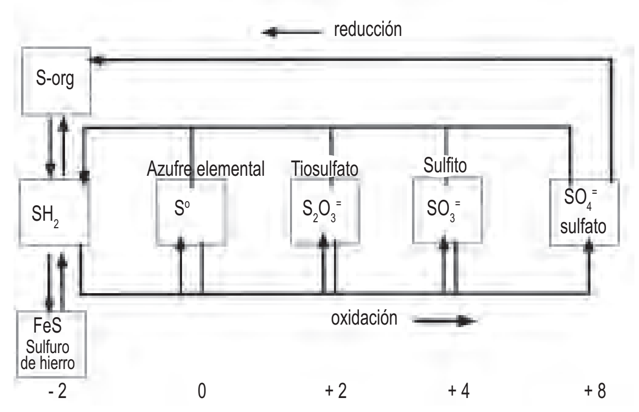


Figura 2 – Cambios en estados de oxido-reducción en compuestos con azufre

Como se observa las transformaciones que sufre este elemento en el suelo tienen mucha similitud con las del nitrógeno

- la reserva en el suelo es orgánica (75-90% del S-total)
- la nutrición vegetal depende de la actividad mineralizante de la microflora del suelo
- la sulfooxidación es un proceso similar a la nitrificación en el plano bioquímico y ecológico
- la sulfhidrización, o mineralización de compuestos azufrados orgánicos hasta sulfuros o H_2S, es muy similar a la amonificación
- la sulfatorreducción es una respiración anaerobia, como la desnitrificación, con las mismas consecuencias negativas en la nutrición vegetal pero importante para eliminar a la atmósfera sulfatos en aguas.

Sin embargo, ambos ciclos presentan algunas diferencias

- la fuente primaria de nitrógeno disponible para la actividad biológica lo constituye la atmósfera y en el caso del azufre es la roca madre. La principal fuente en el suelo es la **pirita (FeS_2)** de las rocas ígneas, que sufre oxidaciones liberando sulfato durante la meteorización y la formación del suelo. Esta es la forma

del S asimilado por los vegetales y microorganismos y también lavado. Muchos suelos lo retienen como minerales sulfatados insolubles (sulfatos de calcio y magnesio).

- el del azufre es considerado un ciclo **más complejo**; muchas de las transformaciones, sobre todo la sulfooxidación de innumerables compuestos con grado de oxidación intermedio entre sulfuros y sulfatos, no están bien dilucidadas. El ciclo de este elemento incluye la mineralización de residuos vegetales, animales, fertilizantes, aportes por la lluvia y ciertos gases, como SO_2, H_2S que llegan al suelo en cantidades importantes en zonas fabriles, del orden de 100 kg/ha/año en regiones industrializadas de Europa y Estados Unidos.

Mineralización-inmovilización

Los vegetales requieren sulfatos como fuente de azufre, el que deben reducir a forma sulfhidrilo (-SH) en sus células. La **mineralización** de las formas orgánicas de este elemento es un importante proceso microbiológico que asegura la provisión de sulfatos en la zona radical. Formas orgánicas como proteínas, aminoácidos, antibióticos como la penicilina, compuestos húmicos, ésteres sulfúricos, etc. son transformados en compuestos cada vez más simples por una micropoblación muy variada, en condiciones muy amplias de aireación, temperatura, pH, liberando finalmente compuestos inorgánicos, sulfatos y/o sulfuros.

La **inmovilización** incorpora estos iones a las células microbianas que compiten por ellos con los vegetales. La biomasa microbiana del suelo regula las transformaciones del azufre y la actividad microbiana regula tanto los flujos de azufre entre las diferentes reservas (sulfatos solubles, S-orgánico lábil y S-orgánico resistente) y es responsable de la conversión de fracciones pasivas a otras muy activas, como los aminoácidos con cisteína.

Como en el caso del nitrógeno, las combinaciones del azufre en el humus, conducen a una estabilización. Los productos finales están en parte gobernados por las condiciones del medio:

- **en aerobiosis** el producto final es el sulfato, acompañado de nitratos, CO_2, H_2O, fosfatos, etc.

- **en anaerobiosis**, como ocurre en el caso de la putrefacción de proteínas, se acumula H_2S y productos de mal olor como los **mercaptanes:** metilmercaptán (CH_3-SH), metil-etil-mercaptán (CH_3-S-C_2H_5), tóxicos para los vegetales, junto a aminas, amidas, NH_3, fosfatos, sales ferrosas, CO_2, CH_4, ácidos orgánicos, alcoholes.

Los **aminoácidos** son rápidamente degradados en suelos bien aereados, con liberación de sulfatos. Los microorganismos heterótrofos pueden también liberar sulfatos de compuestos de estructura R-SH. La cisteína desulfhidrasa es responsable de la liberación de sulfuros a partir de **cistina**:

$$HSCH_2CHNH_2COOH + H_2O \rightarrow CH_3COCOOH + H_2S + NH_3$$

En el caso de la **metionina** puede aparecer sulfato luego de su incorporación al suelo, o bien la degradación puede ocurrir con formación de productos finales volátiles, metilmercaptán (CH_3-SH) y dimetildisulfuro (CH_3SSCH_3), realizado por bacterias y hongos.

Las sulfatasas (sulfohidrolasas) como la arilsulfatasa, son enzimas que hidrolizan ésteres sulfúricos, con enlaces tipo R-O-S:

$$R\text{-}O\text{-}SO_3^- + H_2O \longrightarrow R\text{-}OH + SO_4^= + H^+$$

La mineralización de compuestos azufrados y la liberación de formas minerales, reducidas u oxidadas (mineralización neta) depende, como en el caso del nitrógeno, del contenido de S%, de la relación C/S y a veces de la N/S.

La **relación crítica C/S** debajo de la cual el azufre excede las necesidades de la microflora y se libera al medio, varía como en el caso ya considerado del nitrógeno, con los materiales orgánicos que llegan al suelo, pero se puede establecer valores entre **100 a 150/1**. En general, las relacio-

nes críticas son altas y sólo excepcionalmente los vegetales se ven perjudicados por la acción microbiana. En ese caso resulta favorable fertilizar con compuestos con azufre. Algunos microorganismos, sobre todo los anaerobios, que no pueden emplear sulfatos, porque no son formados en ambientes carentes de oxígeno, pueden asimilar formas orgánicas del azufre, como los aminoácidos, proteínas.

Las condiciones que favorecen a la **inmovilización** son las mismas que afectan a la **mineralización**, pero en sentido inverso:

pH y temperatura bajas, humedades elevadas, restos vegetales con menos de 0,1-0,2% de S

La **microflora** activa en la mineralización es muy amplia, una multiplicidad de especies de bacterias, hongos, protozoos, algas. Es la misma población que interviene en la mineralización de restos vegetales y animales que llegan al suelo y actúan en todas las condiciones compatibles con la actividad biológica. Todos los factores que favorecen el crecimiento microbiano, favorecerán la liberación de sulfatos:

- aumento de temperatura en el rango mesófilo, la liberación de sulfatos es escasa debajo de 10ºC y se eleva con la temperatura hasta 35ºC

- encalado en suelos ácidos, una mejor aireación y humedades medias

- la desecación provoca liberación de sulfatos de la materia orgánica por vías no biológicas

En general, se piensa que el azufre se mineraliza al mismo rango que el nitrógeno, es decir entre un 1 al 3% al año en suelos de la zona templada

Sulfooxidación

Numerosos compuestos inorgánicos del azufre con estado de oxidación menor que el sulfato (+6) pueden ser oxidados biológicamente o químicamente hasta sulfato: sulfuros (-2); Sº (O); tiosulfato $S_2O_3^=$ (-2); sulfitos $SO_3^=$ (+ 4).

A diferencia de lo que ocurre en la nitrificación, en donde sólo un grupo pequeño de microorganismos autótrofos muy eficientes y una multiplicidad de heterótrofos poco eficientes son los responsables de la formación de nitratos, en la sulfooxidación intervienen:

1. **organismos quimioautótrofos** del género *Thiobacillus* aerobios y anaerobios

2. **bacterias quimiolitotrofas filamentosas** y sobre todo acuáticas de la familia *Beggiatoaceae*

3. **bacterias fotosintéticas sulfurosas purpúreas y verdes** de las familias *Chromatiaceae y Chlorobiaceae*

4. **un amplio número de microorganismos quimioheterótrofos variados**

En el suelo son los thiobacilos y los organismos heterótrofos los que desempeñan un rol cuantitativamente más importante, los otros dos grupos son sobre todo acuáticos y las bacterias fotosintéticas requieren anaerobiosis y dosis altas de sulfuros.

1. ***Thiobacteriaceae***: estas bacterias sulfooxidantes poseen la capacidad de obtener energía y poder reductor para su biosíntesis celular de la oxidación de compuestos inorgánicos del azufre. La actividad metabólica de las bacterias oxidantes del azufre y del hierro juega importante rol en distintos campos de importancia económica como son la purificación de minerales con uranio, cobre y otros metales, la corrosión de cañerías metálicas, en la tecnología del petróleo, polución de aguas y fertilidad de suelos.

Además de la habilidad para producir ácido sulfúrico, algunos de sus integrantes son capaces de reducir nitratos y otros óxidos del N hasta N_2, limitando la provisión de uno de los más importantes nutrientes nitrogenados. Mucha atención han recibido las transformaciones realizadas por miembros del género *Thiobacillus*, pero aún restan sin dilucidar mecanismos enzimáticos y la naturaleza de muchos intermediarios en la oxidación (cuadro 2).

Los **thiobacilos** son bacterias Gram negativos, no esporulados, algunos móviles por flagelo polar, y deposi-

tan azufre elemental (Sº) fuera de la célula. El género comprende 9 especies, de las cuales 5 son bien conocidas:

- 4 son autótrofas: *T. thiooxidans, T. thioparus, T. denitrificans y T. ferroxidans*
- *el T. novellus* es autótrofo facultativo, que puede oxidar compuestos orgánicos e inorgánicos con azufre.

Cuadro 2- Transformaciones de compuestos reducidos del azufre

	Δ(kcal/mol)
1. $H_2S + 2\,0_2 \longrightarrow H_2SO_4$	- 160
2. $S^0 + 1{,}5\,O_2 + 2H^+ \longrightarrow H_2SO_4$	- 118
3. $S_2O_3^= + O_2 + H_2O \longrightarrow 2SO_4^= + 2H^+$	- 211
4. $5S_2O_3^= + 8NO_3^- + H_2O \longrightarrow 10SO_4^= + 4N_2 + 2H^+$	- 893
5. $SO_3^= + 0{,}5\,O_2 \longrightarrow SO_4^=$	- 60
6. $(R\text{-}S\text{-}S\text{-}R' + HS^- + H_2S) + 3H_2O + 3NAD(P) \longrightarrow SO_3^= + 3NAD(P)H + 5H^+$	+ 186
7. $SO_3^= + H_2O + NAD(P) \longrightarrow SO_4^= + NAD(P) + H^+$	+ 34

T. thiooxidans y T. novellus pueden realizar la reacción 3), *T. thiooxidans*, la 2). *T. denitrificans* obtiene energía de la reacción 4) utilizando también en anaerobiosis el Sº como donador de electrones. En aerobiosis (es anaerobio facultativo) puede oxidar según las ecuaciones 2) y 3).

T. ferroxidans puede realizar las reacciones 2) y 3) pero puede desarrollarse empleando la energía de la oxidación de sales ferrosas, en lugar de las formas reducidas del azufre:

$$12\,FeSO_4 + 3O_2 + 6\,H_2O \longrightarrow Fe\,(SO4)_3 + 4\,Fe(OH)_3$$

Todos los thiobacilos, con excepción del *T. novellus*, emplean CO_2 como fuente de carbono y sales amoniacales como fuente de N, incluso el *T. denitrificans* que no es capaz de asimilar nitratos.

El pH óptimo de las especies varía:

- *para T. thiooxidans y T. ferroxidans* en la vecindad de pH 2,0 a 3,5
- para el resto predominan las preferencias en la neutralidad o ligeramente alcalino. Salvo el *T. denitrificans* son **aerobios obligados**

Se han propuesto diferentes esquemas metabólicos en la oxidación de compuestos con azufre. Algunos autores suponen pasajes por politionatos:

$$S^o \longrightarrow S_2O_3^= \longrightarrow S_4O_6^= \longrightarrow S_3O_6^= \longrightarrow SO_3^= \longrightarrow SO_4^=$$

tiosulfato tetrationato tritionato sulfito sulfato

El rápido crecimiento de estos organismos, 2 horas de tiempo de generación cuando crecen a expensas de tiosulfato, y la relativa versatilidad del grupo, los hacen muy útiles para estudios fisiológicos asociados a modos quimioautótrofos de vida.

La **autotrofia obligada**, más extendida entre los nitrificantes, es una propiedad variable entre los oxidantes del azufre y está completamente ausente entre las bacterias del hidrógeno. Muchos estudios se realizan para tratar de explicar esta característica distribuida al azar entre los principales grupos de procariotas:

- la incapacidad de estos organismos de emplear fuentes orgánicas exógenas puede deberse a la ausencia de **permeasas** específicas que incorporen a las moléculas orgánicas. Pero esta teoría ha sido cuestionada pues se observó que muchos thiobacilos pueden incorporar el C^{14}-acetato cuando metabolizan sulfuros, aunque esta fuente contribuye con muy poco del carbono recientemente sintetizado
- la explicación más aceptada se basa en la ausencia de un **ciclo de ácidos tricarboxílicos** funcional por falta de la enzima **α-cetoglutarato deshidrogenasa** y a niveles muy bajos de succínico y málico deshidrogenasas. Al no poder mediatizar la oxidación de la acetil-CoA, el ciclo funciona como dos metabolismos separados puramente biosintéticos.

- los electrones en los organismos quimioautótrofos con excepción de las bacterias del hidrógeno, entran en la CTE por los **citocromos** con la intervención de piridín nucleótidos. La oxidación de la mayoría de los compuestos orgánicos es vía NADH, que podría estar impedida en estos organismos. La cadena transportadora de electrones de los microorganismos autótrofos es poco conocida.

2. Las bacterias filamentosas deslizantes del grupo *Beggiatoa-Thiotrix* son características de medios ambientes acuáticos ricos en sulfuros o suelos hidromórficos. Contienen frecuentemente inclusiones de azufre en sus células que pueden oxidar a sulfato.

3. Las bacterias fotosintéticas sulfurosas purpúreas de la familia *Chromotiaceae y* las sulfurosas verdes de la familia *Chlorobiaceae* emplean sulfuros y acumulan S° en las células que puede ser luego oxidado a sulfatos. Dominan en barros y en anaerobiosis donde se acumulan sulfuros (capítulo 3).

4. Microorganismos heterótrofos: numerosas especies de bacterias aerobias, hongos y levaduras pueden oxidar formas reducidas de azufre, aunque la energía liberada sólo representa una pequeña porción de la que la célula necesita. Numerosos hongos pueden liberar sulfatos de moléculas orgánicas como proteína-tiourea, con rendimiento energético menor que los thiobacilos. Se discute el rol de los microorganismos heterótrofos en la oxidación de compuestos azufrados pues si bien su rendimiento es bajo, éste puede ser compensado por su alta densidad en algunos ambientes.

Ecología de la sulfooxidación

- En suelos inundados son las bacterias fotosintéticas y las *Beggiatoaceae* los principales organismos en la oxidación del azufre

- En aireación estos grupos no son los dominantes y los thiobacilos y los organismos heterótrofos son los responsables del proceso.

- La humedad debe favorecer los intercambios gaseosos ya que la microflora es aerobia, excepto el *T. denitrificans* que debe encontrar alto nivel de nitratos y anaerobiosis para reducir sulfuros y otros compuestos reducidos.

- El encalado de suelos ácidos favorece la acción de la población sulfooxidante. En general el pH no desciende demasiado en los suelos pues la vegetación se encarga de asimilar los sulfatos a medida que éstos se van produciendo. Existen situaciones en las cuales la acumulación puede ser importante y entonces el pH puede descender algunas unidades con el consiguiente inconveniente en el desarrollo vegetal.

El suelo puede recibir grandes cantidades de **azufre en polvo** cuando se desea corregir suelos alcalinos o en la lucha contra actinomicetes patógenos de papa o batata, como el *Streptomyces scabies*. En ambos casos la actividad de los thiobacilos asegura rápida formación de ácido sulfúrico que baja el pH a niveles no soportados por estas especies.

Ciertos ambientes anegados, ricos en materia orgánica y sulfuros de pirita (FeS_2), cuando son drenados y expuestos al aire liberan sulfatos, el pH cae debajo de 4,0 y los vegetales pueden perjudicarse.

$$3FeS_2 + 11O_2 + 2H_2O \longrightarrow 3Fe^{+++} + 4H^+ + 6SO_4^{=}$$

La aplicación de **inoculantes** granulados con **azufre elemental y fosfato de roca inoculado con thiobacilos** permiten aportar a las pasturas sulfatos y fosfatos más rápidamente en el trópico húmedo que en regiones templadas y áridas. El ácido sulfúrico formado ayuda en la solubilización de:

- fosfatos tricálcicos, llevándolos a fosfato di y monocálcico, asimilables por las plantas

- compuestos de manganeso (a partir de Mn^{+4}), K, Ca, Al, Mg. Se requiere humedad (lluvias) y es más efectivo en suelos ácidos. Estos inoculantes son usados cuando fertilizantes como el superfosfato no están disponibles y se cuentan con depósitos de fosfato de roca.

El cuadro 3 resume algunas de las funciones benéficas de este grupo bacteriano y el cuadro 4 señala algunas de las contraindicaciones de la actividad sulfooxidante.

Cuadro 3- Bacterias oxidantes del azufre en la naturaleza

- Ayuda a la extracción de cobre, uranio, etc. por lavado ácido de residuos de minas
- Modificación pH del suelo
- Detoxificación rizosférica con H_2S, que lo oxidan a sulfato
- Remoción de sulfuros, tiosulfato y tiocianato de residuos fotográficos
- Fertilización con inoculantes como el Biosuperfosfato: S^0 + fosfato de roca + thiobacilos

Cuadro 4- Problemas asociados a la actividad de organismos sulfooxidantes

- Acidificación de residuos de minas de extracción de minerales
  * por procesos químicos como biológicos
  * oxidantes tanto del S como del Fe^{++}
  * se producen 12 moles H_2SO_4 por 3 moles SFe oxidado
- Corrosión de acero y concreto
  * acidificación de suelos con sulfatos
  * lluvias ácidas
  * oxidación del azufre favorece la solubiliza ción de metales pesados

La sulfooxidación tiene consecuencias nefastas en la **corrosión aerobia** de diversos materiales, como cemento, piedra y metales por la intervención de un conjunto de especies que llevan la oxidación hasta la formación de ácido sulfúrico. Estos materiales se disuelven literalmente con el consiguiente deterioro en monumentos, edificios, etc. Los sulfuros provienen del suelo o de la polución atmosférica.

Sulfatorreducción

La **reducción asimilativa** de sulfatos es similar a la de los nitratos y es realizada en la biomasa microbiana.

La **reducción desasimilativa** la realizan las bacterias sulfatorreductoras, que oxidan compuestos orgánicos e H_2 y emplean a los sulfatos como **aceptores de electrones** en la cadena transportadora anaerobia. Su rol en el ciclo del azufre es similar al de las bacterias desnitrificantes, con la diferencia que éstas son estrictamente anaerobias y aquéllas, anaerobias facultativas. Esta actividad (cuadro 5) es muy evidente en zonas de barros, en el fondo de estanques y lagos y a lo largo de la costa del mar. Signos de este proceso son:

- **fuerte olor a sulfhídrico**
- **manchas negras** de los barros y suelos donde ocurre a causa de la precipitación del SFe

Cuadro 5- Reducción de los sulfatos

Asimilativa
- Se produce H_2S, pero se convierte rápidamente en S-aa
- Ocurre en aerobiosis y anaerobiosis y es realizado por amplio rango de organismos
- Esencial en el crecimiento microbiano y vegetal donde los $SO_4^=$ son asimilados

Desasimilativa
- Se produce H_2S y se excreta
- Ocurre anaeróbicamente en respiraciones
- Limitada a pocos organismos que incluyen *Desulfovibrio, Desulfotomaculum*
- Acoplada a la oxidación de acetato, etanol o hidrógeno

En ciertas zonas donde la acumulación de materia orgánica es importante y el nivel de sulfatos en aguas freáticas es muy alto, la sulfatorreducción puede convertir en

inhóspita la región para la vegetación a causa de la toxicidad del H_2S. La **rizosfera** de muchos cultivos puede favorecer el proceso por la exudación de materiales carbonados. Estos cultivos no se desarrollan normalmente en suelos salinos, con alto nivel de sulfatos, anegados y donde la temperatura es alta, y los pH neutros. El proceso es retardado por aireación o el agregado de nitratos, sales férricas o mangánicas, que permiten elevar el potencial de óxido-reducción.

La **microflora** responsable está confinada a dos grupos de anaerobios estrictos: formadores de esporas del género *Desulfotomaculum* y asporógenas del género *Desulfovibrio*. Son típicos habitantes de sedimentos anaerobios con materia orgánica y sulfatos, resultando en una masiva generación del gas H_2S. Esta actividad permite, también en anaerobiosis, la actividad de las bacterias fotosintéticas sulfurosas (púrpuras o verdes) que emplean el H_2S como donador de electrones en la fotosíntesis, reoxidándolo en anaerobiosis y a la luz, constituyendo un verdadero ciclo.

Los sulfatorreductores del género *Desulfovibrio* son Gram negativos, asporógenos, bacilos curvados o vibrioides, con flagelos polares. No pueden emplear el acetato, que se acumula como producto final en la oxidación de sustratos orgánicos. Emplean malato y lactato, obtenienen energía por fosforilación a nivel del sustrato con participación de la acetil Co-A. En ausencia de sulfatos, algunos de estos microorganismos pueden fermentar piruvato, malato o fumarato.

Las especies más conocidas son *D. desulfuricans; D. vulgaris; D. africans* y algunos pueden emplear además de los donadores de electrones orgánicos, el H_2, aunque son incapaces de crecer en medio estrictamente mineral con CO_2 y requieren adición de acetato. La ecuación general es:

$$2\,CH_3CHOH\text{-}COOH + SO_4^{=} \longrightarrow 2\,CH_3COOH + 2CO_2 + S^{=} + 2H_2O$$

$$4\,H_2 + SO_4^{=} \longrightarrow 4\,H_2O + S^{=}$$

Los compuestos menos oxidados que los sulfatos (sulfitos, politionatos, tiosulfatos, Sº) son reducidos más fácilmente que los sulfatos, ya sea en la vía asimilativa o en la desasimilativa.

Mecanismo enzimático

La reducción de $SO_4^{=}$ a $S^{=}$ implica la transferencia de 4 pares de electrones y en la vía desasimilativa se reconocen tres enzimas:

ATP sulfurilasa $SO_4^{=} + ATP \longrightarrow APS + P\text{-}P$

pirofosforilasa $P\text{-}P + H_2O \longrightarrow 2P$

APS reductasa $APS + 2e^- \longrightarrow AMP + SO_3^{=}$

La conversión es similar a la oxidación de $SO_3^{=}$ a $SO_4^{=}$ por thiobacilos y bacterias sulfurosas purpúreas, con el APS intermediario, mientras que la vía asimilativa emplea adenilsulfato. La reducción del $SO_3^{=}$ a $S^{=}$ ha sido establecida recientemente con la identificación de una sulfito reductasa:

$$3\,SO_3^{=} + 2e^- \longrightarrow S_3O_6^{=}$$

Otras dos enzimas (tritionato y tiosulfato reductasas) reducen tritionito a $S^{=}$ con producción de sulfito:

$$S_3O_6^{=} + 2e^- \longrightarrow S_2O_3^{=} + SO_3^{=}$$
$$S_2O_3^{=} + 2e^- \longrightarrow S^{=} + SO_3^{=}$$

Los esporulados del género *Desulfotomaculum* realizan los mismos metabolismos, difiriendo solamente en la composición química de la sulfito reductasa. La vía que conduce a la asimilación de los sulfatos es más sencilla y no se acumulan intermediarios entre sulfito y sulfuro. La síntesis de ATP en la sulfatorreducción desasimilativa se forma en una cadena transportadora de electrones de la cual se conocen varios componentes: citocromo c3, citocromo del tipo b, quinonas, una flavoproteína, la ferrodoxina.

Ecología del proceso

Las condiciones que deben reunirse para que el proceso ocurra son similares a las de la desnitrificación:

- **alto tenor en sulfato**
- **donadores de electrones orgánicos**

- **anaerobiosis** que se logran en suelos sometidos a hidromorfismo muy reductor, en suelos salinos con alto nivel en sulfatos y en la rizosfera.

Se aprecia el precipitado negro característico del sulfuro ferroso. El proceso es de consecuencias desfavorables para las plantas pues consume sulfatos, uno de los principales nutrientes y además el H_2S es tóxico para la mayoría de las especies. La precipitación como SFe elimina esta toxicidad. El suelo se alcaliniza localmente, los sulfuros dan origen a bases que forman carbonatos o bicarbonatos de sodio. En aguas, se favorece la eliminación de sulfatos, depurando los cauces de agua.

La figura 3 presenta resultados en suelo no rizosférico salino y en la rizosfera de plántulas de maíz creciendo en el mismo suelo (Dommergues, Mangenot, 1970). Se observa el efecto positivo en la interacción de un factor biológico: presencia o ausencia de raíces y factores físicos del suelo: saturación y compactación. Los donadores de electrones y las condiciones de anaerobiosis se reunieron en el suelo rizosférico, naturalmente salino.

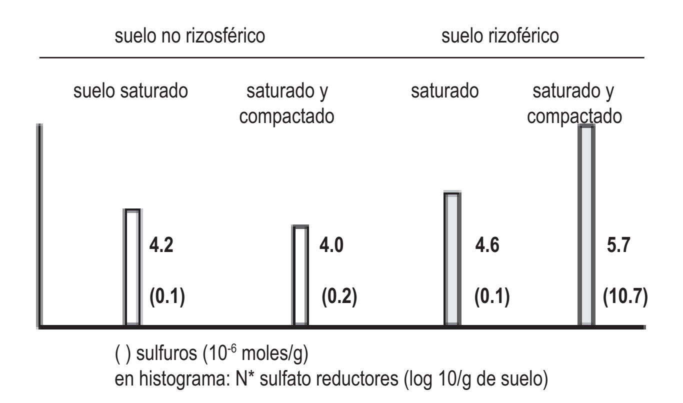


Figura 3- Sulfatorreducción en la rizosfera de maíz en suelo salino

Este proceso es responsable también de la corrosión anaerobia de **metales**. Los desulfovibrios actuarían como agentes de despolarización, al consumir el H en las zonas catódicas de los metales, facilitando la reducción de los sulfatos a sulfuros (cuadro 6).

Cuadro 6- Importancia económica de la sulfatorreducción

- En océanos, lagos y ambientes inundados, el O del sulfato excede al O_2 libre y es crítico para la degradación de la MO. En el océano, el 50% de la degradación de los restos orgánicos ocurre por la sulfato- reducción. Depuración de aguas
- La corrosión anaeróbica de cañerías de hierro enterradas representa importantes pérdidas
- Aguas ennegrecidas por acumulación de sulfuro ferroso, consecuencia de la actividad sulfatorreductora
- Asociaciones entre bacterias sulfato reductoras y fotosintéticas pueden resultar en importantes depósitos de azufre

Volatilización de compuestos azufrados

La carencia de métodos sensibles apropiados para la determinación de las distintas formas: H_2S; SO_2; metanotiol (CH_3SSCH_3), etanotiol (CH_3CH_2SH), disulfuro de carbono (CS_2), carbonil sulfuro (COS) de origen microbiano a partir de descomposición de restos vegetales, abono de granja, limitaron los estudios.

La cromatografía de gases permite determinaciones y mostró que la liberación se produce sobretodo en condiciones de anaerobiosis y no en todos los suelos. Dimetilsulfuro y pequeñas cantidades de carbonil sulfuro, S_2C, metilmercaptán y dimetildisulfuro, fueron los principales productos.

En condiciones normales de campo pequeñas pérdidas pueden atribuirse a esta causa. Gran cantidad de SO_2 llega a la atmósfera, pero proviene de fuentes de polución, industrias, automóviles, etc. Algo de SO_2 toma origen en la oxidación del H_2S liberado biológicamente.

Los gases con S son componentes indeseables de la atmósfera por su intenso y desagradable olor y por sus efectos adversos en el ambiente y el clima.

El H_2S en un gas muy tóxico para ciertas cianobacterias y líquenes, organismos empleados como indicadores biológicos de polución. Las actividades del hombre contribu-

yen con más de la mitad de los compuestos azufrados en la atmósfera, con incrementos en los próximos años. En zonas industrializadas esta polución superará a la originada por vía biológica.

En resumen: el azufre es un elemento esencial para todos los organismos, existe en gran número de estados de oxido-reducción en combinaciones orgánicas e inorgánicas. Sus transformaciones bióticas y abióticas pueden resultar benéficas o perjudiciales para los ecosistemas. En los terrestres, son bien conocidos los procesos que aseguran la provisión de sulfatos y otras formas solubles para las plantas. Pero, en ciertas circunstancias, exceso de S puede ser polucionante, en aguas, o en la atmósfera cuando se liberan gases de la quema de compuestos ricos en azufre (bitumen, lignita), responsables luego de las lluvias ácidas. El azufre es importante en muchos procesos industriales, como la producción de concreto, asfalto.

Ciclo biológico del fósforo

La figura 4 presenta los procesos de origen biológico involucrados en las transformaciones de este elemento. A diferencia de los ciclos de C, N y S, el ciclo del P no presenta componentes gaseosos, de modo que no son importantes los movimientos desde y hacia la atmósfera, aunque pequeñas cantidades de fosfina gas (PH_3), pueden detectarse en lagos o pantanos, bajo condiciones reductoras.

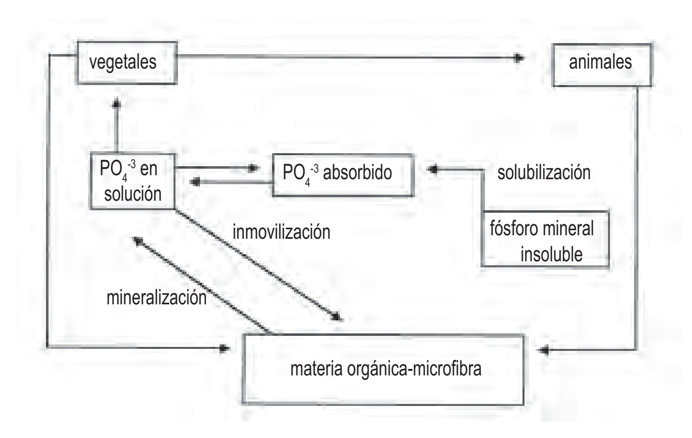


Figura 4- Transformaciones biológicas de compuestos con fósforo

La principal reserva de P en la tierra la constituyen los sedimentos marinos (8,4 x 10^{14} ton), los suelos (0,96-1,6 x 10^{11} ton), fosfatos inorgánicos solubles (HPO_4^{-2}, PO_4^{-3}) en el océano (8 x 10^{10} ton), rocas con apatita (1,9 x 10^{10} ton) y en la biota o biomasa (2,7 x 10^9 ton). Los niveles de P en la biomasa terrestre (2,6 x 10^9 ton) excede mucho a la marina (5-12 x 10^7 ton) (Stevenson y Cole, 1999).

Los mayores depósitos ricos en apatita (como el sulfato de roca) se encuentan en sedimentos en el fondo de océanos y antiguos mares (Amértica del Norte). Los tratamientos del fosfato de roca con ácidos inorgánicos (sulfúrico y fosfórico) se emplean para producir fertilizantes más solubles. El conocido como **superfosfato** resulta de la mezcla de aproximadamente cantidades iguales de fosfato de roca con H_2SO_4 (de 60-70%) y contiene un 10% de P. La mayoría del P aplicado al suelo como fertilizante, a veces más del 90%, no es tomado por los cultivos y es retenido en formas insolubles o fijadas. Este elemento se va acumulando en los suelos, pero en forma no disponible para los cultivos.

La toma anual por los vegetales en forma de ($H_2PO_4^-$ y HPO_4^{-2}) se calcula en 2 x 10^8 ton, presentes en la solución del suelo, proporción extraída es menor en la parte cosechada (4-7 x 10^6 ton), En ciertas ocasiones, los compuestos fosforados pueden migrar hacia el mar donde se depositan como sedimentos insolubles (1,7 x 10^7 ton).

El P constituye el segundo elemento en importancia para los vegetales y microorganismos, sólo superado por el nitrógeno. Forma moléculas ricas en energía (ATP, UTP, etc.). En el suelo es la fracción orgánica la que contiene la mayor proporción de fósforo (30 al 85% del P total), más alto en suelos ácidos:

- entre un 30-50% consiste en **fitina**, sobre todo como fosfato de inositol (material de reserva vegetal)
- un 3% se encuentra en ácidos nucleicos
- un 1% en fosfolípidos, los más comunes: **lecitina, cefalina,** el fosfato es esterificado con una base.

Los cultivos agrícolas contienen aproximadamente 0,05 a 0,5% de P en sus tejidos y alrededor del 1% de todo el P

de un ecosistema se encuentra en componentes vivos. En todas las combinaciones orgánicas e inorgánicas el P se encuentra oxidado como **ortofosfato (P^{+5}),** la mayoría de las veces como complejos con Ca, Fe y Al y minerales silicato de modo que los vegetales, animales o microorganismos no deben reducir a este elemento como lo hacen con compuestos oxidados de N o S.

En suelos con pH entre 5 y 8 la cantidad de fosfato no disociado H_3PO_4 y trivalente PO_4^{-3} insoluble es mínima y prevalecen las formas solubles ($H_2PO_4^-$ y HPO_4^{-2}):

$$H_3PO_4 \underset{+H+}{\overset{-H+}{\rightleftarrows}} H_2PO_4^- \underset{+H+}{\overset{-H+}{\rightleftarrows}} HPO_4^{-2} \underset{+H+}{\overset{-H+}{\rightleftarrows}} PO_4^{-3}$$

La mayoría del P orgánico integra **moléculas húmicas** formadas a partir de fracciones orgánicas de la vegetación, de los microorganismos y animales. En general se observa una buena correlación en los suelos entre los contenidos de C, N y P orgánicos (aproximadamente 100/10/1) y las relaciones C/P orgánicos varían entre 100-300/1 y el N/P varía entre 5-20/1.

En ecosistemas naturales, el ciclo del P está prácticamente cerrado: la mayoría del P de los vegetales es reciclado por degradación microbiana del mantillo y restos orgánicos. Es el caso de suelos forestales tropicales, casi todo el P se encuentra en la materia orgánica viva y muerta y los suelos contienen muy baja cantidad de este elemento que no permiten el desarrollo agrícola luego de la deforestación.

Los procesos microbianos involucrados en las transformaciones del fósforo son:

- **mineralización-inmovilización**
- **solubilización-precipitación**

Mineralización-inmovilización

Un grupo amplio de microorganismos posee las enzimas necesarias (**fosfatasas**) para liberar fosfatos de moléculas orgánicas. Escasos estudios se han realizado con compuestos individuales fosforados y se cuenta con pocos detalles sobre la descripción de la microflora involucrada. Numerosas evidencias indican importante rol del P orgánico (P-org) en la nutrición vegetal, se ha observado que esta fracción es la que disminuye en mayor proporción, por procesos de mineralización.

La parte del ciclo de mayor importancia para las plantas está sumarizada en el siguiente equilibrio

$$\text{P-org del suelo} \xrightarrow[\text{muy rápido}]{} \text{Pi lábil} \xrightarrow[\text{muy lento}]{} \text{P no lábil}$$

La mineralización del P-orgánico depende en primer lugar de la actividad de los microorganismos, pero también de los invertebrados, sobre todo lombrices, que ejercen importante función acelerando hasta 2-3 veces la liberación de Pi en materiales vegetales por molienda y humectación. El flujo de P a través de la **biomasa microbiana** ha sido calculado en 4,6 kg P ha^{-1} $año^{-1}$, del mismo orden del removido en grano y paja, en un suelo arable no abonado.

Se observa correlación entre la conversión del N y P a formas inorgánicas (8-15 partes de N mineral/1 de fosfato) y también se correlacionan la liberación de CO_2 y la mineralización de P (100-300 / 1); valores vinculados a las proporciones de estos elementos en el **humus**.

Las **fosfatasas** catalizan reacciones cuyo esquema general es:

$$\mathrm{RO\overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{OH}{|}}{P}}OH} + H_2O \longrightarrow \mathrm{ROH} + \mathrm{HO\overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{OH}{|}}{P}}OH}$$

Los sustratos pueden ser: **etilfosfato, glicerofosfato, fenilfosfato.** Las moléculas con diésteres (fosfolípidos, ácidos nucleícos) requieren diferentes enzimas para su degradación. Por comodidad, estas fosfatasas son designadas de acuerdo a los sustratos que atacan:

- **Fitasas**: hidrolizan la unión éster-fosfato de sales solubles de ácido fítico o de sus sales de Mg o Ca: la **fitina**,

liberando inositol y ortofosfato. Los fosfatos se liberan de a uno, dando penta, tetra, tri, di y monofosfato, para liberar finalmente inositol libre. Esta actividad enzimática está ampliamente distribuída entre los microorganismos del suelo: hongos, bacterias, actinomicetes.

La adición de materia orgánica aumenta la actividad por incremento de la población específica. El pH ácido y la adsorción a arcillas limitan la degradación. Fitasas vegetales contribuyen a la degradación de la fitina y ácido fítico.

- **Nucleasas:** están ampliamente distribuidas y la liberación de ortofosfato es rápida en el suelo a partir tanto de ARN como de ADN. Para muchos microorganismos heterótrofos los ácidos nucleícos pueden ser empleados como única fuente de nutrientes y de energía y la liberación de Pi ocurre luego de la acción de enzimas despolimerizantes.

- **Fosfolipasas**: los fosfolípidos más comunes en el suelo como la **lecitina** (fosfatidil colina) y la **fosfatidiletanolamina**, liberan Pi luego de hidrólisis enzimática, la población emplea el esqueleto orgánico de la molécula y el P necesario, el que excede la demanda microbiológica, es liberado.

Es frecuente evaluar la actividad fosfatasa incubando el suelo con sustrato apropiado como glicerofosfato, fenilfosfato y se determina el ortofosfato liberado por distintos procedimientos, como por colorimetría. La actividad es pronunciada en la rizosfera y es afectada también por la profundidad, la estación.

La presencia de fosfatasas y fitasas ha sido verificada en **ectomicorrizas** de árboles y en **endomicorrizas arbusculares**, que absorben más P-orgánico a partir de suelos deficientes en este elemento (capítulo 16).

Las formas más solubles son directamente asimiladas por las plantas. Los inositol-polifosfatos son considerados resistentes al ataque enzimático en el suelo por su capacidad para formar derivados insolubles con hierro y aluminio. Amonio y aminas pueden, sin embargo, formar complejos solubles con fitatos férricos.

Los ácidos orgánicos producidos por bacterias y otros microorganismos pueden ser también causa de liberación de fosfatos a partir de P-orgánico.

Las bacterias y actinomicetes acumulan mayor proporción de P (1,5-2,5%) en peso seco que los hongos (0,5-1%) o los vegetales (0,05-0,5%). En suelos cultivados se estima que las bacterias solas **inmovilizan entre 4 y 10 kg P/ha**. Si se considera que también lo toman hongos y actinomicetes, se aprecia que los valores inmovilizados son similares a los que son removidos por los cultivos.

Las **relaciones críticas C/P** en los restos son altas, **100 a 300/1,** aproximadamente 0,2% en P.

La deficiencia puede aparecer en caso de incorporación de grandes cantidades de restos carbonados, en donde una fertilización puede evitar la falta de este nutriente en los cultivos posteriores, pero en general los problemas graves de inmovilización se presentan en contadas situaciones con la incorporación masiva de rastrojos de muy pobre contenido en fósforo.

Procesos de óxido-reducción

Poca atención se ha prestado a los procesos de óxido-reducción llevados a cabo por la microflora del suelo en compuestos fosforados. Este elemento, como en nitrógeno, puede encontrarse en combinaciones desde fosfina (P^{-3}) a ortofosfato (P^{+5}). Algunos microorganismos heterótrofos pueden asimilar fosfita (HPO_3^{-2}) y oxidarlo a fosfato. En suelos húmedos, *Clostridium butyricum* puede reducir fosfato a fosfita e hipofosfita. Estas reacciones son biológicas ya que no ocurren al agregar inhibidores al suelo. como el tolueno.

En presencia de nitrato o sulfato la reducción de fosfato es más lenta ya que los primeros iones son empleados de preferencia como aceptores de electrones. Como estas reacciones no son importantes en la naturaleza, no han recibido mayor atención y son muy pocas las referencias bibliográficas.

Solubilización

Una proporción importante de fosfatos solubles agregados a suelos ácidos puede insolubilizarse o fijarse a coloides (adsorción). Muchos suelos contienen minerales, como la fluorapatita (Ca_{10} $(PO_4)6F_2$) o hidroxiapatita que

se usan como fertilizantes, como el polvo de huesos, roca molida. Sin embargo, estas formas insolubles del fósforo pueden ser aprovechables por los vegetales luego de la acción **solubilizadora** de una microflora variada.

Gran número de especies bacterianas, de hongos y actinomicetes son capaces de solubilizar fosfato tricálcico y otras formas insolubles y su número puede alcanzar 10^5-10^7/g. En la rizosfera la actividad puede ser muy intensa como consecuencia de la activa proliferación microbiana que puede disolver los fosfatos a lo largo de la raíz los que son inmediatamente absorbidos.

Los ácidos pueden ser:

- **orgánicos y CO_2 (ácido carbónico)** producidos por la microflora y por las raíces
- **inorgánicos,** como nítrico, sulfúrico, también producidos por procesos microbianos

Se aislaron microorganismos solubilizadores de fosfatos en semillas y raíces de diferentes plantas. Un halo que rodea a la fuente insoluble de Pi en la superficie de cajas de Petri permite reconocer a los organismos solubilizantes. La detección de la acción de hongos puede ser dificultosa; el agregado de estreptomicina (50 mg/L) permite evidenciarlos sin la interferencia de las bacterias.

Mecanismos: la quelación del calcio, hierro y aluminio por ácidos orgánicos, la formación de complejos fosfohúmicos y la competencia entre iones humatos y fosfatos por superficies adsorbentes, explican la solubilización.

La figura 5 muestra los resultados de una experiencia en la que se incorporó a un suelo azufre elemental y sulfato de amonio y se comparó el nivel de fósforo soluble por la absorción de este elemento en un cultivo.

Thiobacillus produce ácido sulfúrico a partir de azufre elemental y se emplea en la formulación de un fertilizante fosforado, el «**biosuper**», en gránulos con 5 partes en peso de fosfato de roca molida, una parte de S° y un inóculo de thiobacilo (0,1%), de gran éxito en climas muy húmedos y resulta una alternativa en países que no pueden preparar superfosfato en cantidades importantes.

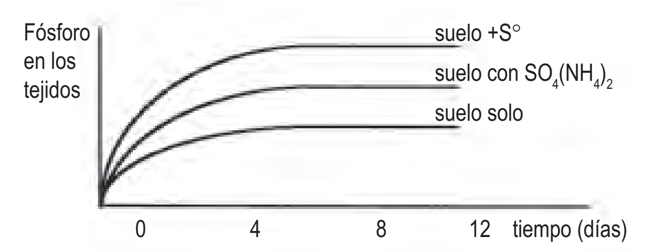


Figura 5 - Asimilación de P por vegetales a partir de fosfato tricálcico

La producción de ácido nítrico por los microorganismos nitrificantes es otra manera de incrementar la solubilización de fosfatos, como se observa en la experiencia de la figura 5. En condiciones anaerobias, el ácido sulhídrico facilita la solubilización ya que se forma sulfuro ferroso insoluble y se libera ácido fosfórico. Este proceso explica la gran disponibilidad de fosfatos en suelos inundados de arroz.

El **efecto rizosférico** favorable a la solubilización ha sido puesto en evidencia en numerosos trabajos. La inoculación de vegetales con microorganismos solubilizantes del fósforo ha sido aplicado en algunos países que inoculan plantines con **hongos micorrícicos y bacterias solubilizadoras del fósforo**. En Rusia y otros países se empleó mucho la inoculación de cultivos con *Bacillus megatherium var phosphaticum* (fosfobacteria) organismo con gran capacidad de mineralizar formas orgánicas de P, sobre todo en Mollisoles, con incrementos en los rendimientos de 50-70%.

Pero luego no se continuó con esta práctica, en parte por el hecho de que los suelos contienen buen nivel de organismos que liberan formas solubles de P a partir de formas orgánicas o inorgánicas y se hace innecesario la inoculación con microorganismos seleccionados.

En resumen: este ciclo es complejo e incluye el almacenamiento del P en organismos vivos, materia orgánica muerta y formas inorgánicas. Las plantas lo absorben como ortofosfato, presente en la solución del suelo. Por lo que la renovación de esta fuente por procesos de mineralización y solubilización, es muy importante para la nutrición vegetal. Un concepto útil lo constituye la partición del P en el suelo en reservas o *pools*, relacionadas con la disponibilidad de formas orgánica e inorgánicas para las plantas.

Como más de dos tercios del P total de los suelos es orgánico, con picos máximos en turbas, suelos forestales no cultivados y suelos tropicales, un ciclo muy activo ocurre que posibilita el reciclaje de formas orgánicas e inorgánicas (mineralización-inmovilización). La **mineralización** está asegurada por una micropoblación poco específica que emplea al P en sus necesidades plásticas y libera el exceso como ortofosfato.

La inmovilización, proceso simultáneo y opuesto, no es un peligro de competencia con los vegetales salvo en el caso de la incorporación de grandes cantidades de rastrojos con muy bajo nivel de P%. El nivel crítico se considera **0,2% en P total y las relaciones C/P críticas son altas (200-300/1).** Un proceso muy importante lo constituye la **solubilización** de formas insolubles del P como fosfato tricálcico, hidroxiapatita, etc., que es realizado por una población inespecífica por la liberación de ácidos orgánicos o minerales.

Los procesos de **oxidorreducción** no tienen gran importancia en la naturaleza.

Las reacciones de fijación son importantes en relación a la eficiencia de uso de los fertilizantes con P por las plantas. En suelos ácidos, el fosfato es precipitado como fosfatos insolubles de Fe o Al, o son adsorbidos en la superficie de óxidos. En suelos calcáreos, dominan los fosfatos de Ca insolubles.

Los hongos micorrícicos pueden jugar importante rol incrementando la disponibilidad de fosfatos a los vegetales (capítulo 16).

Ciclo biológico del hierro y otros elementos

Las transformaciones microbiológicas de gran número de minerales tienen gran importancia en la recuperación de subproductos de la minería, actuando como verdaderos concentradores de metales que se encuentran en pequeñas dosis. Procesos microbianos transforman nutrientes minerales en formas disponibles para otras formas de vida. El **hierro** sufre una serie de procesos de naturaleza física, química o biológica y a pesar de ser uno de los principales constituyentes de la corteza terrestre, se presenta frecuentemente en forma no disponible para los vegetales como (Fe^{+++}) y los ejemplos de carencias son frecuentes. La figura 6 presenta las transformaciones de origen biológico que ocurren entre los compuestos con hierro.

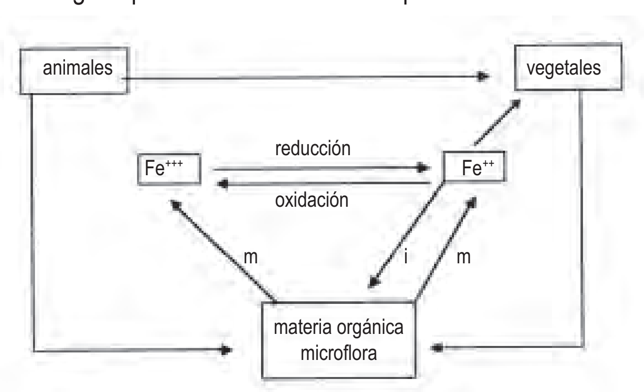


Figura 6 - Transformaciones biológicas del hierro

Los procesos biológicos de compuestos con hierro pueden resumirse:

- **mineralización ⟷ inmovilización**
- **oxidación ⟷ reducción**
(el Fe^{+++} precipita como hidróxido)
- **solubilización ⟷ precipitación**

Resultante de la actividad biológica el hierro puede ser: **precipitado** en la naturaleza por acción de bacterias oxidantes del Fe^{++}, por la acción de heterótrofos que degradan la fracción orgánica de complejos organo metálicos, por la liberación de O_2 por algas y por la creación de medios alcalinos o **solubilizado** por la formación de ácidos, la presencia de condiciones de reducción o por la formación de ciertos complejos.

La mineralización e inmovilización son procesos realizados por variada microflora heterótrofa activa en amplios rangos de condiciones ambientales. No se señalan casos de problemas en la inmovilización de iones ferrosos en parte por el hecho de que los restos vegetales requieren este elemento en pequeñas cantidades.

Oxidación
Químicamente, el ión ferroso predomina en solución debajo de pH 5 y el férrico sobre 6. Los cambios de pH de la

solución del suelo pueden alterar el estado de oxidación de este elemento. El potencial de oxidorreducción también determina la forma dominante: debajo de 0,2 voltios es el ion ferroso el que predomina. Es difícil entonces, en este elemento, determinar cuándo los procesos son biológicos o simplemente físico-químicos.

Las llamadas **bacterias del hierro** oxidan sales ferrosas con generación de ATP en CTE aerobia. Precipita hidróxido férrico alrededor de las células, frecuentemente en cápsulas o vainas dando colonias floculentas que típicamente crecen adheridas a las paredes de tubos con medio líquido. Se desarrollan de preferencia en aguas pobres en materia orgánica soluble, provistas de O_2 y con sales ferrosas o manganosas.

Los géneros más conocidos son: *Sphaerotilus* en cuyas vainas se deposita óxido férrico. Pueden crecer rápidamente como quimioheterótrofos y así se aíslan en cultivo puro. No se conoce el rol de la deposición de hidróxido férrico: si es un proceso de significado fisiológico y si pueden desarrollarse quimiautotróficamente. La quimioautotrofia es más evidente en otra bacteria no relacionada a la anterior: *Gallionella* que no crece en medios orgánicos y sí en medio mineral con depósito de SFe como fuente de Fe^{++}. Resulta difícil obtenerla en cultivo puro. La mayoría de las colonias algodonosas obtenidas están formadas en su mayor parte por hidróxido férrico y las bacterias están localizadas en ramificaciones terminales de los depósitos de $Fe\ (OH)_3$.

Otros microorganismos comprometidos en la oxidación: *Leptothix*, quimioautótrofo facultativo, puede obtener energía también de la oxidación de compuestos orgánicos; *Thiobacillus y Ferrobacillus*. Obtienen energía de la oxidación:

$$4\ Fe^{+++} + O_2 + 4\ H^+ \longrightarrow 4\ Fe^{+++} + 2\ H_2O$$

El organismo está frecuentemente recubierto por vaina de $Fe\ (OH)_3$ que se origina por vía biológica:

$$Fe_2\ (SO_4)_3 + 6\ H_2O \longrightarrow 2Fe\ (OH)_3 + 3\ H_2SO_4$$

Muchas cepas pueden emplear en lugar de sales ferrosas, compuestos de azufre reducidos: S^o, $S^=$ o $S_2O_3^=$. La oxidación del hierro es realizada por sistema transportador de electrones localizado en la membrana e incluye **citocromos del tipo c y a**. No se sabe si la actividad está confinada en la membrana interna o si reside en ambas: externa e interna. Ciertos thiobacilos (formalmente llamados *Ferrobacillus*) son incapaces de oxidar tiosulfato, y otros son incapaces de oxidar $S^=$. Otras cepas que aparentemente están adaptadas a crecer con glucosa, pierden la habilidad para crecer autotróficamente con hierro. Esta variabilidad entre bacterias relacionadas estaría ligada a la presencia de un plásmido.

Microorganismos **heterótrofos** están también vinculados a la oxidación y precipitación del hierro, pero resulta difícil determinar si el proceso es biológico o físico-químico. Poco o nada de la energía liberada es utilizada por los organismos. Muchas veces el hidróxido férrico se deposita en la superficie creando una masa compacta mezclada con materia orgánica en desagües instalados en suelos mal drenados. El mismo proceso ocurre en el interior de gasoductos produciendo serias oclusiones.

Reducción

En suelos mal drenados o sometidos a períodos de anaerobiosis el hierro al estado ferroso se hace predominante. El proceso de reducción del ion férrico a ferroso es casi exclusivamente biológico, ya que no se detectan mayores cambios en suelos estériles o con agregados de inhibidores metabólicos. La figura 7 muestra lo que ocurre en ambientes sometidos a anegamiento: el potencial de óxido-reducción (Eh) desciende provocando la reducción rápida del hierro y del manganeso. La materia orgánica estimula el proceso, comparable desde el punto de vista metabólico con la desnitrificación y la sulfatorreducción, es decir respiraciones anaerobias con sustratos orgánicos. En medios ácidos no se requieren potenciales redox tan bajos para solubilizar el hierro.

Otro mecanismo biológico indirecto está relacionado a la liberación de sustancias orgánicas de carácter reductor por parte de los microorganismos del suelo: ácidos orgánicos, aldehidos, que provocarían ligera reducción del hierro. El consumo de O_2 por microorganismos aerobios, provoca descenso del potencial redox del suelo y reducción del hierro.

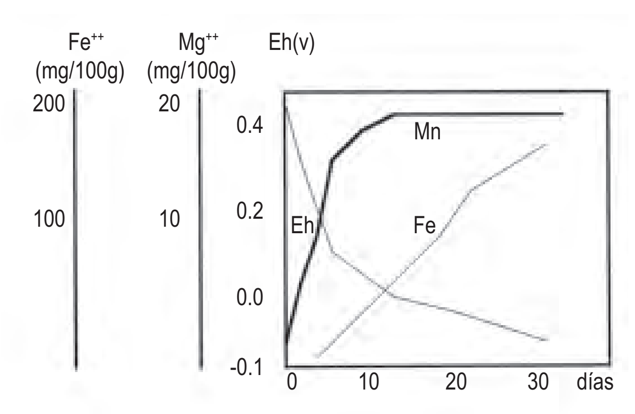


Figura 7 - Potencial redox e iones Fe^{++} y Mn^{++} en suelo anegado

La **microflora** responsable de la reducción de iones férricos en anaerobiosis es muy numerosa en el suelo y su densidad puede alcanzar valores de 10^4 - 10^6 células/g. Entre las bacterias se citan especies de *Bacillus, Clostridium, Klebsiella, Pseudomonas y Serratia*. Muchas son anaerobias facultativas y pueden emplear además del oxígeno, nitratos y manganatos como aceptores de electrones.

Consecuencia de este fenómeno es la **corrosión anaerobia** de materiales de hierro o acero enterrados en períodos de deficiencia en O_2. Gasoductos, oleoductos y cañerías pueden inutilizarse en pocos años. Cuando se reúnen condiciones de anaerobiosis, temperaturas medias, pH superiores a 5,5 y presencia de sulfatos, las consecuencias son más graves. Bacterias anaerobias del género *Desulfovibrio* contribuyen a la corrosión produciendo H_2 y electrones libres:

$$4\ Fe + SO_4^{=} + 4H_2O \longrightarrow FeS + 3Fe\ (OH)_2 + 2OH^-$$

Otra consecuencia del proceso es la aparición en suelos hidromórficos de horizontes de reducción, o **gley**, de coloración **gris verdosa o azulada,** debida fundamentalmente al hierro ferroso. Puede precipitar sulfuro ferroso, de color negro. La presencia de donadores de electrones orgánicos es necesaria en la reducción. Este fenómeno puede reproducirse en una columna de suelo enriquecida con un azúcar en anaerobiosis parcial o completa (columna de Winogradsky) (capítulo 3).

El líquido toma las coloraciones típicas del hierro al estado reducido y la velocidad de desaparición del azúcar y la aparición de Fe^{++} tienen la forma sigmoide típica del crecimiento bacteriano.

Formación de complejos orgánico-metálicos

Productos del metabolismo microbiano: ácidos orgánicos, aminoácidos, etc., metabolitos de origen vegetal y microbiano y moléculas derivadas del humus pueden formar una variedad de complejos con iones metálicos entre ellos, con el hierro. Estas moléculas tienen mucha importancia en el plano pedológico pues explican la migración en el perfil de éste y otros elementos. Las moléculas como **citrato férrico, lactato o succinato férrico** pueden migrar en un suelo a pH 5,0 mientras que en estado libre, este ion es insoluble.

Las sustancias complexantes de origen microbiano: ácidos cítrico, oxálico, fumárico, 2-cetoglucónico, láctico, pueden solubilizar diversos elementos, como el potasio, calcio, fósforo, hierro y numerosos oligoelementos, sobre todo acumulados en suelos en anaerobiosis o microaerofilia.

Los **sideróforos** son moléculas de gran afinidad por el Fe^{+++} producidos por microorganismos y plantas y contribuyen a la toma de este elemento en ambientes de baja disponibilidad. Proteínas de membrana permiten la entrada del complejo organo-metálico. En la célula éste se desdobla liberando el ion férrico que es oportunamente reducido por enzimas microbianas y asimilado como ion ferroso. Estas sustancias juegan importante rol en la **lucha biológica**, en la competencia por el hierro con microorganismos fotopatógenos (capítulo 17).

Cuando el complejo organo-metálico se mineraliza por acción de heterótrofos, el hierro es liberado y precipita como sales insolubles férricas. La reacción puede ocurrir tanto en anaerobiosis como en ausencia de aire y es realizada por un gran grupo de bacterias, actinomicetes y hongos.

En resumen: otros elementos además del C, N, S, P, sufren transformaciones en el ambiente. Formas reducidas

de Fe^{+2} , Mn^{+2}, Se^{+2}, responsables de los colores grises típicos de los suelos con pobre drenaje, pueden ser oxidados por bacterias quimioautotróficos, liberando energía. Formas oxidadas (Fe^{+++}, Mn^{+4}), actúan como aceptores finales de electrones en respiraciones anaerobias. La reducción provoca un incremento en la solubilidad de esos elementos. El mercurio es contaminante de muchos ambientes, sobretodo de sedimentos acuáticos, puede ser metilado microbiológicamente en sedimentos a metilmercurio, altamente tóxico que se puede acumular en la cadena trófica. Las formas iónicas pueden ser también reducidas a mercurio elemental, volátil, provocando la remoción de este tóxico del suelo hacia la atmósfera.

Bibliografía

Dommergues, Y. , Mangenot, F. **Ecologie microbienne du sol**. 1970, Masson, París.

Fenchel, T., King, G. M. & T. H. Blackburn, **Bacterial Biogeochemistry: The Ecophysiology of Mineral Cycling**, 1998, Academic Press

Frioni, L. **Procesos microbianos**. 1999, Fundación de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

Stevenson, F. J. & M. A. Cole **Cycles of Soils: carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur, micronutrients**, 1999, Wiley & sons, New York

Sylvia, D. M., J. J. Fuhrmann, P. G. Hartel, D. A. Zuberer, **Principles and Applications of Soil Microbiology,** 1998, Prentice Hall, New jersey

Preguntas de repaso

1) ¿Cómo se relaciona la quimiosíntesis con las transformaciones del azufre?
2) Discuta cómo la oxidación de compuestos reducidos del azufre pueden permitir incrementar la productividad primaria en el fondo de efluentes termales
3) ¿Cómo se explican los depósitos negros alrededor de raíces en suelos salinos anegados?
4) Analice similitudes y diferencias entre los ciclos del S y del N
5) ¿En qué tipos de suelos puede encontrar bacterias sulfatorreductoras activas?
6) Si un rastrojo con relaciones: C/N/P de 500/20/1 se agrega al suelo, ¿dominará la mineralización o la inmovilización del P? ¿Por qué?
7) ¿Puede un microorganismo facilitar la solubilización de compuestos con Fe y P simultáneamente?

Los microorganismos y sus interacciones

13 La rizosfera

Los microorganismos interactúan con las plantas a nivel del follaje y las hojas, en la superficie del suelo, alrededor de las raíces y semillas, donde encuentran abundantes materiales carbonados y un ambiente particular con condiciones físico-químicas diferentes que las del suelo sin cultivar. Las plantas, por su parte, reciben numerosos metabolitos de la micropoblación edáfica, muchos de ellos promotores de crecimiento.

La figura 1 muestra las principales zonas de interacción biológica, conocidas como:

- **filosfer**a (ambiente sobre las hojas) (F)
- **rizosfera** (zona del suelo afectada por las raíces) (R)
- **restos vegetales o mantillo** (ramas, hojas, etc. sobre el suelo) (M)
- **espermatosfera** (zona del suelo afectada por los exudados y descamaciones de las semillas) (E)



Figura 1- Zonas de interacción entre microorganismos y vegetales

El cuadro 1 resume los efectos recíprocos entre vegetales y microorganismos y el cuadro 2 señala la importancia de las sustancias liberadas por los vegetales al suelo.

Cuadro 1- Interacciones entre los microorganismos y las plantas

Efecto de las plantas sobre los microorganismos

Directos

- aporte de sustancias energéticas, estimulantes o inhibidoras, como moléculas: orgánicas, vitaminas, fitohormonas, sustancias que producen agregados. Exudados, secreciones, restos de tejidos que actúan como fuentes de energía, C, N, S, etc. o como sustancias tóxicas
- modificación del medio físico (estructura) o químico (inmovilización), control biológico de microorganismos fitopatógenos

Indirectos

- modificación del medio **químico** por los procesos de mineralización-inmovilización, precipitación solubilización, oxido-reducción de materiales orgánicos o minerales, el ambiente **físico** alterando la estructura, el régimen hídrico, el pH, la composición de la atmósfera del suelo y el ambiente **biológico**, estimulando las interacciones microbianas a ese nivel

Efecto de los microorganismos sobre los vegetales

Directos: por los compuestos liberados, minerales, fitohormonas
Indirectos: actuando como microorganismos deletéreos o fitopatógenos

Los efectos de los microorganismos rizosféricos sobre a las plantas pueden catalogarse (figura 2) (Kennedy, 1998) como:

Neutros: no afectan el crecimiento

Benéficos: existe creciente evidencia de que la microflora saprofita de la rizosfera incluye componentes benéficos que pueden incrementar el crecimiento vegetal y los rendimientos significativamente por:

- aumento de la disponibilidad y toma de nutrientes minerales

- provisión de sustancias promotoras del crecimiento

- supresión de microorganismos deletéreos y patógenos en la rizosfera.

Deletéreos: que pueden afectar negativamente el crecimiento vegetal, sin necesariamente parasitar al tejido (alteraciones en el aporte de agua, iones y sustancias promotoras del crecimiento vegetal, cambiando las funciones y/o limitando el crecimiento de raíces).

Patógenos: disminuyen el rendimiento por producción de enfermedades: numerosas bacterias, actinomicetes, hongos, producen enfermedades que provocan importantes pérdidas en los cultivos.

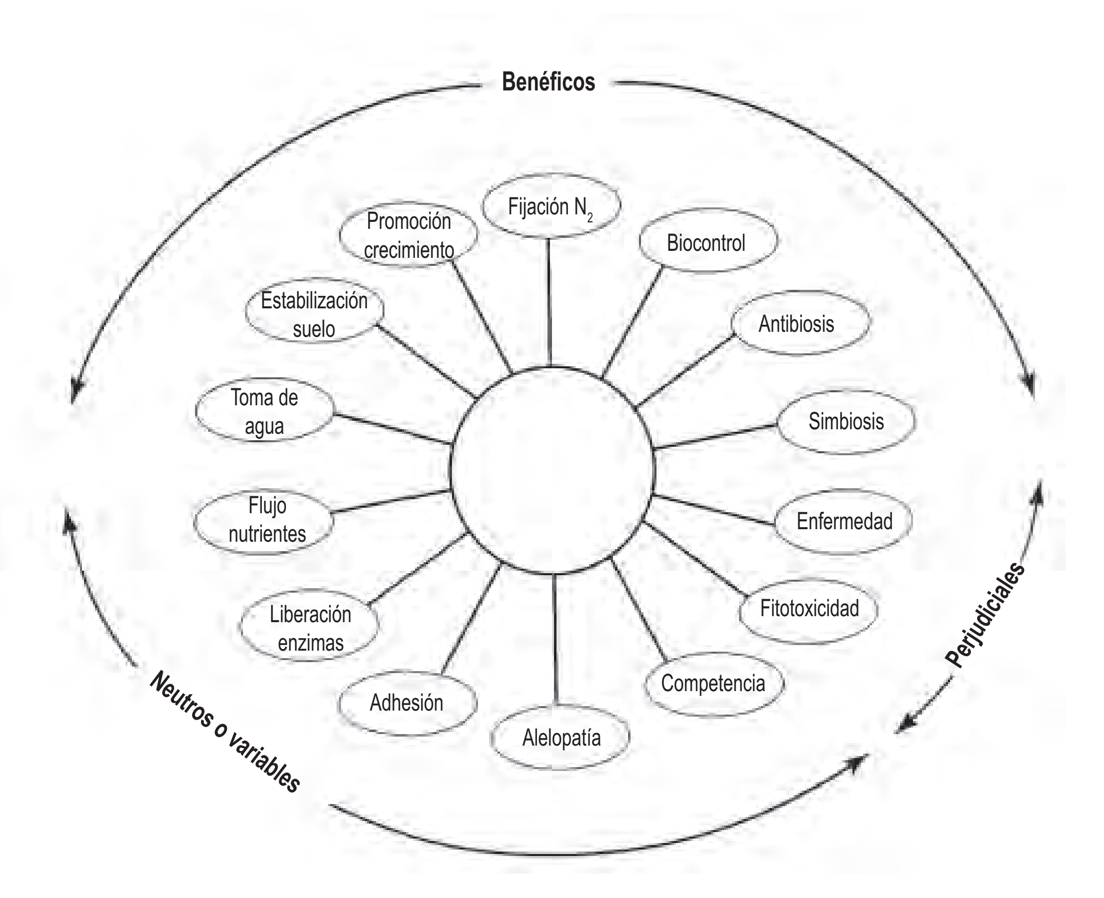


Figura 2- Efectos neutros, benéficos, perjudiciales y variables de la comunidad microbiana rizosférica sobre le crecimiento vegetal

Conceptos generales

Desde comienzos del siglo pasado se reconoció que la zona del suelo vecina a las raíces inducía, en general, una mayor actividad de los microorganismos y se introdujo el término **rizosfera**, para definir a esta región. Desde entonces, son numerosos los estudios sobre las actividades microbianas en esta zona, que se define como el **volumen de interacción entre el sistema radical de los vegetales y su inmediato medio suelo.** Su validez en términos de gradientes microbiológico y químico ha sido demostrada por varios autores, con un máximo de efecto en la zona de contacto con las raíces, hasta distancias variables que podrían llegar a algunos milímetros. Luego el efecto es despreciable. El cuadro 2 muestra la importancia de la masa radical y los aportes en forma de exudados, lisados, secreciones, que resultan importantes insumos para los microorganismos.

La **microflora** es afectada por los exudados radicales y por los aportes de restos de tejidos y células.

Los microorganismos estimulados actúan sobre la planta, poniendo a su disposición moléculas orgánicas que son absorbidas por las raíces, como aminoácidos, vitaminas, antibióticos, fitohormonas y contribuyen a su nutrición mineral por los procesos de mineralización y solubilización, de ciertos elementos.

Las interacciones biológicas son muy intensas en esta región y los fenómenos de sinergismo o de antagonismo son exaltados.

La **rizosfera**, en sentido amplio, se define como la fina capa de suelo que se adhiere firmemente a las raíces, pero que se puede separar por lavado y agitación moderada en agua. Se puede dividir en rizosfera **próxima y alejada**, según el tiempo y la intensidad de agitación. Es la zona del suelo con influencia de las raíces, con máximo efecto desde la superficie de la raíz hasta 1-3 mm (pudiendo llegar a 5 mm). Constituye un microecosistema muy especializado que propicia el crecimiento de una población microbiana diversificada.

El **rizoplano** lo constituye el suelo en contacto íntimo con la superficie de las raíces y se extrae por agitación vigorosa de las mismas luego del tratamiento anterior. Si no se indica expresamente, al hablar de rizosfera, se incluye en general a la rizosfera y al rizoplano.

Muchos microorganismos colonizan la raíz por heridas o por acción enzimática. Se habló un tiempo de **endorrizosfera**, pero se comprende que esta definición no es correcta ya no está involucrado el suelo. Se habla de microorganismos **endofíticos**: simbióticos, saprofitas o parásitos.

Cuadro 2- Importancia de las raíces en el suelo

Planta de centeno de 16 semanas
13.000.000 de raíces axiales y laterales
50 km de largo total, más de 200 m^2 de superficie

Materiales depositados en la rizosfera: exudados- secreciones- mucílagos- lisados
- ➢ importantes fuentes de carbono, nitrógeno, energía
- ➢ varían en función de la especie vegetal y del ecosistema
- ➢ pueden alcanzar más de 500 mg/g de raíz seca (normal, entre 10 y 100 mg/g)

Métodos de estudio

Las investigaciones en esta región no son sencillas, es necesario trabajar con plantas vivas, en medios artificiales: soluciones hidropónicas, cultivos sobre agar, vermiculita u otros soportes, o en el suelo mismo, en macetas en invernáculo o en el campo. Los datos obtenidos son puntuales y brindan información sobre las relaciones microflora-vegetal en un momento dado. Las condiciones en este hábitat son muy dinámicas y los productos liberados por |os vegetales son simultáneamente biodegradados o adsorbidos fuertemente a los coloides del suelo.

Por este motivo, los estudios sobre exudación se realizan en medios estériles y el nivel de producción no pueden extrapolarse a condiciones naturales y además los datos son puntuales: **las sustancias son producidas y biodegradadas en forma simultánea.**

Algunas de las técnicas empleadas (resumen en cuadro 4) (capítulo 8 y Anexo práctico):

- **seguimiento de microorganismos en este habitat:** se emplean mutantes marcadas por resistencia a antibióticos o con características fisiológicas que permiten reconocerlas fácilmente en aislamientos, en estudios de **recuentos (NMP).** Se obtienen con transposones (Tn5), hibridización del ADN, empleo de sondas, etc.

- recuentos de grupos fisiológicos y cálculo de la relación

$$R/S = \frac{\text{densidad de algún grupo por gramo de suelo rizosférico}}{\text{densidad por gramo de suelo sin cultivo}}$$

Permiten determinar efectos estimulantes o inhibidores de ciertos cultivos sobre procesos microbianos de interés, como celulolisis, fijación del N_2, nitrificación, etc. Resulta difícil comparar resultados de distintos autores si no se han empleado técnicas, sistemas radicales y medios y condiciones de cultivo semejantes.

- **colonización de la raíz** (microscopía de luz, fluorescente, electrónica) muy útil para conocer la distribución de los microorganismos y su grado de colonización. El **microscopio óptico** permitió mostrar que sólo entre un 5 a 10% de la superficie de la raíz está cubierta de microorganismos, hecho que desmiente la creencia muy extendida de que las raíces estaban cubiertas por un espeso manto microbiano. Esta idea se sustentó en los altos recuentos, al expresarlos por gramo de raíz.

La **microscopía fluorescente,** con anticuerpos marcados con sustancias que fluorescen en luz ultravioleta, permite determinar la colonización de distintas porciones de la raíz por cepas de interés agrícola, como los rhizobios, y brindan invalorable información sobre la distribución de bacterias en el sistema radical.

El **microscopio electrónico** de transmisión y de barrido permitió grandes avances en el conocimiento de la distribución espacial de los componentes de la interfase suelo-raíz, la forma de agrupación de las poblaciones, la presencia y colonización del mucigel, sus relaciones con las arcillas, la lisis de ciertas bacterias.

- **determinaciones de biomasa microbiana:** por recuentos o por la técnica de fumigación son muy empleadas para determinar los efectos estimulantes o inhibidores de distintas rizosferas.

El cuadro 3 (Frioni, 1990) muestra la fracción de C orgánico presente en la biomasa del suelo rizosférico de cuatro gramíneas cultivadas en la zona de Río Cuarto (Argentina), evaluada en el estado de grano lechoso, en relación a la del suelo sin cultivar.

Cuadro 3 - Carbono orgánico en la biomasa (%), en la rizosfera de gramíneas (*)

	maíz	sorgo	mijo perla	mijo común	suelo solo
(C- biomasa/ C-orgánico total) %	6,19[a]	5,99[a]	5,35[ab]	5,64[a]	4,52[b]

(*) Dos o más tratamientos señalados por la misma letra no difieren significativamente por Tuckey al 1 %

- **empleo de elementos radioactivos,** C,N,S, etc. permiten un estudio más detallado de procesos microbianos en este ambiente

- **modelización**, diseños experimentales y matemáticos son muy empleados y permiten predecir los efectos de variaciones en: el contenido de agua del suelo, la densidad de las raíces, los niveles de exudación, el agregado de distintos sustratos, el efecto rizosférico a distancias variables de las superficies radicales. Estos modelos señalaron marcada reducción del efecto a medida que la distancia de la superficie de la raíz aumenta, como se observa en microscopía electrónica y constituyen una herramienta invalorable en la predicción de cambios en las poblaciones microbianas en respuesta a modificaciones de la interfase suelo-raíz.

Cuadro 4- Métodos de estudio en la rizosfera

- mutantes marcadas por resistencias a antibióticos, biocidas, o por características fisiológicas
- recuentos de grupos fisiológicos y relación R/S (densidades en suelo rizosférico/ densidades en suelo sin efecto radical)
- colonización de la raíz: microscopía de luz, fluorescente, electrónica
- determinaciones de biomasa microbiana, por recuentos o muerte de propágulos y su mineralización (CO_2)
- empleo de elementos radioactivos: C, N, S, etc.
- modelización: diseños experimentales que predicen los efectos de cambios en exudados, agua, etc. sobre la población microbiana

Origen y naturaleza de los materiales orgánicos

Se reconocen varias categorías de compuestos orgánicos en la vecindad de las raíces (figura 3 y cuadro 5). Es necesario establecer si la sustancia en cuestión es producida por el microorganismo en cultivo puro y se encuentra a concentración fisiológicamente activa en la rizosfera.

1. Exudados: compuestos de bajo peso molecular en general solubles en agua que liberan las células hacia espacios intercelulares y luego al suelo. Su liberación no está mediatizada por un metabolismo. Son azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, hormonas, vitaminas. La exudación radical se puso de manifiesto luego de aplicaciones foliares de sustancias con elementos radioactivos (P^{32}, $^{14}CO_2$, N^{15}, etc.)

2. Secreciones, compuestos de bajo o alto peso molecular liberados como resultado de procesos metabólicos mediados por el aparato de Golgi (hidratos de carbono polimerizados, enzimas)

3. Mucílagos vegetales, son originados en el ápice de la raíz y segregados por el Golgi, o hidrolizados de polisacáridos de la pared primaria y de células del extremo de la raíz, segregados por pelos capilares o producidos por degradación bacteriana de células epidérmicas muertas.

4. Mucigel, se restringe este término al material gelatinoso de la superficie de las raíces creciendo en suelos normales, no estériles. Incluye mucílagos vegetales, células bacterianas y sus productos metabólicos (cápsulas, capas mucosas, gliocalix) así como coloides minerales y materia orgánica del suelo. El **mucigel** es una zona muy importante que mantiene a las raíces y al suelo en contacto y es un reservorio de nutrientes y agua de importancia para el vegetal en épocas de sequía. Se encuentra presente siempre en las células de ápice de la raíz, pero su extensión a lo largo del sistema radical es variable.

5. Lisados son los compuestos liberados por autólisis de las células epidérmicas. Las paredes de estas células son digeridas por los microorganismos que liberan a la rizosfera los productos de su actividad microbiana.

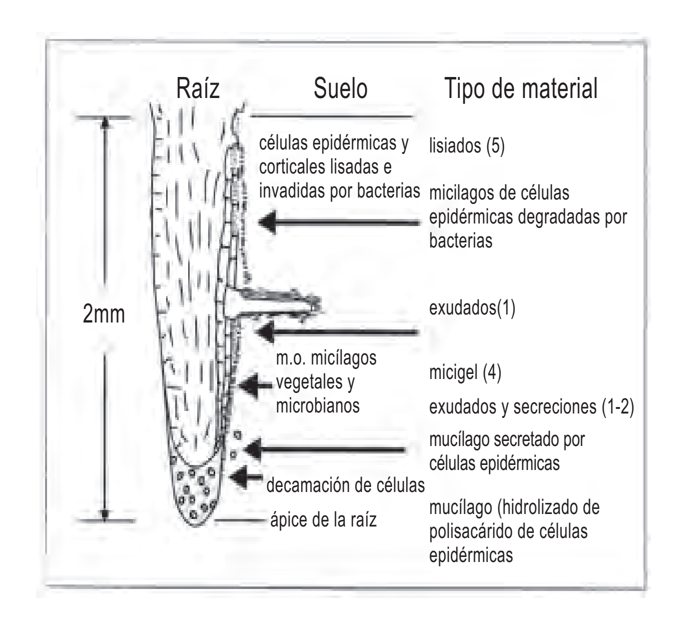


Figura 3 - Materiales orgánicos en la rizosfera

Cuadro 5- Rizodeposición

Exudados (solubles en agua): azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, hormonas, vitaminas		
Secreciones	HdeC, enzimas	
Lisados	autolisis de células de paredes vegetales, de raíces, fauna, microorganismos	
Gases	C_2H_2, CO_2, H_2	
27% del total de la fotosíntesis		
Medidas en hidroponia:		700m³/ha/año en trigo
		300m³/ha/año en cebada
		1.250m³/ha/año en maíz

En estudios en hidroponia de cultivos estériles se ha calculado la cantidad de materiales liberados por las raíces, los que extrapolados a campo dan valores muy altos. Estas cifras pueden representar un peso de entre 7,3 y 12,5 toneladas métricas de materia orgánica, excediendo a los mejores rendimientos en grano. Para algunos autores pueden representar un 27% de la masa total de la planta (cuadro 5). En el suelo, su biodegradación y la adsorción a los coloides, disminuyen la producción neta.

La figura 4 resume los conceptos sobre las transferencias del carbono y su utilización en la rizosfera. El CO_2 asimilado es llevado de la parte aérea a las raíces para la síntesis de nuevas estructuras y puede también ser liberado como exudados: solubles, que difunden, o bien no difusibles, que permanecen en el mucigel. La degradación de estos compuestos más resistentes explicaría un segundo pico en la liberación del CO_2. Un posible tercer pico en el flujo de CO_2 sería resultante de la degradación de restos de células y tejidos y de la penetración de microorganismos en células corticales.

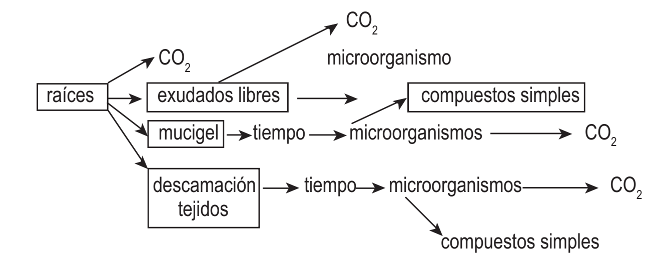


Figura 4 - Flujos de carbono en la rizosfera

Las sustancias orgánicas liberadas por los vegetales se resumen en el cuadro 6.

Cuadro 6- Compuestos encontrados en la rizosfera de vegetales en condiciones axénicas

Aminoácidos: todos los naturales
Ácidos orgánicos: acético, butírico, cítrico, fumárico, glicólico, láctico, oxálico, propiónico, succínico, tartárico, valérico
Hidratos de carbono: arabinosa, desoxiribosa, fructosa, galactosa, glucosa, maltosa, manosa, oligosacáridos, rafinosa, ramnosa, ribosa, sacarosa, xilosa.
Derivados de ácidos nucléicos: adenina, guanina, citosina, timina
Factores de crecimiento: biotina, tiamina, inositol, piridoxina, ácido p-amino benzoico, ácido nicotínico
Enzimas: amilasa, invertasa, fosfatasa, proteasa,proteasa
Antibíóticos
Bacterias: *Agrobacterium tumefaciens* enfermedad (agalla de corona)
Agrobacterium rhizogenes, Agrocina (antibíotico)
Pseudomonas fluorescens: Fenazina, controla enfermedad en trigo (phz⁻ (Tn5): mutante no activa)
Hongos *Trichoderma* spp muchos metabolitos activos, *Gliocadium* spp producen varios antibióticos (patulina, pioluteorina)
Otros compuestos: auxinas, glicósidos, ácido cianhídrico, péptidos, saponinas, CO_2, alcoholes, sustancias quelantes, etc.

Los efectos de las mismas sobre los vegetales se pueden resumir:

- **Reguladores de crecimiento vegetal**: etileno, ácido giberélico (AG), ácido fusárico, ácido indol acético (AIA), ácido abcísico, citoquininas, que se suman a las producidas por las plantas

- **Fitotoxinas**: como ácido para-amino-benzoico, ácido cumárico, acético, butírico, HCN, H_2S, ácido benzóico, etc. Los ácidos alifáticos se acumulan en ambientes

anaerobios (fermentación de pajas) y difunden a la rizosfera. Sus efectos dependen de la longitud de la raíz expuesta al tóxico. Por otro lado la acidez protegería a la planta de microorganismos perjudiciales. Los ácidos aromáticos son más tóxicos

- **Antibióticos:** numerosas moléculas con carácter biostático y biocida son liberados por bacterias, actinomicetes, hongos (patulina, gliovirina,etc). Algunos microorganismos como *Pseudomonas fluorescens, Trichoderma viride* se emplean a nivel experimental como promotores del crecimiento vegetal y en el control biológico de microorganismos fitopatógenos. (capítulo 17)

- **Aglutininas y agentes de agregación del suelo:** las lectinas son glicoproteínas que actúan como receptores reconociendo sitios de adhesión en la superficie de la pared de raíces y de bacterias (rhizobios, azospirilos). Los microorganismos liberan sustancias como gomas, exopolisacáridos, capas mucosas, polímeros que contribuyen a formar agregados entre partículas minerales y el humus.

- **Enzimas:** más de 50 enzimas han sido detectadas en la rizosfera: hidrolasas, pectinasas, ADNasas, oxidorreductasas, que regulan los procesos biológicos en este habitat

Efecto rizosférico sobre grupos microbianos

Bacterias

Numerosas revisiones ilustran sobre efectos rizosféricos positivos. En general se admite, que son las bacterias no esporuladas, Gram negativas, las más favorecidas. La predominancia de especies de *Pseudomonas* en la rizosfera se explica por su alta tasa de crecimiento, latencia reducida, por la aptitud a producir sustancias inhibidoras en el curso del metabolismo de hidratos de carbono y por la síntesis de pigmentos flurorescentes, frecuentemente inhibidores de otras especies.

Las formas filamentosas ramificadas son muy abundantes en la superficie de las raíces, como *Corynebacterium, Mycobacterium.*

Los requerimientos nutricionales de las bacterias del rizoplano y de la rizosfera difieren de las que habitan suelos sin vegetación.

Menos estudios se han realizado sobre los **actinomicetes,** a pesar de que son muy abundantes y activos en la superficie de las raíces. La mayoría de los trabajos están vinculados a la detección de antagonistas que producen antibióticos contra patógenos vegetales. En la rizosfera predominan especies de *Streptomyces y Nocardia.*

Hongos

Las técnicas de recuento muestran en general un efecto rizosférico positivo sobre este grupo (cuadro 7), aunque menos marcado que para las bacterias. Muchos autores sostienen que si el efecto se expresa en función de la biomasa de ambos grupos y no en función del número de individuos, los resultados se invertirían. En los últimos años se ha brindado gran atención a los hongos que colonizan la superficie de las raíces.

La colonización inicial sería realizada por una variedad de especies fúngicas, habitantes del suelo, que a los pocos días sería desplazada por una micoflora más específica, formas típicas de la superficie de las raíces, que persisten hasta la senescencia. Para la detección de estos hongos es necesario lavar las raíces vigorosamente, para eliminar las formas esporógenas, dominantes.

Cuadro 7- Efecto rizosférico de trigo sobre grupos microbianos (ufc g^{-1} suelo)

Organismo	Rizosférico	No rizosférico	R/S
bacterias	120×10^{7}	$5,3 \times 10^{7}$	24/1
hongos	12×10^{5}	1×10^{5}	12/1
actinomicetes	49×10^{6}	7×10^{6}	7/1
protozoos	24×10^{2}	10×10^{2}	2,4/1
amonificantes	500×10^{6}	4×10^{6}	125/1
desnitrificantes	$1,3 \times 10^{8}$	1×10^{8}	1.260/1

ufc= unidades formadoras de colonias

Algas

Este grupo ha sido poco estudiado, ya que por su carácter autótrofo no es afectado directamente por los exudados radicales. Sin embargo, numerosos trabajos señalan estimulación de algunas rizosferas sobre las algas; fenómeno que se ha tratado de explicar por la liberación de factores de crecimiento, el contenido de antibióticos en la rizosfera o por cambios en las propiedades físicas del medio.

Las **interacciones entre microorganismos** tanto sinérgicas como antagónicas son muy afectadas a nivel de este ambiente particular, ya que las poblaciones en altas densidades se afectan intensamente compitiendo por los nutrientes, el espacio.

La figura 5 (Lynch, 1990) muestra la posible distribución de diferentes tipos de microorganismos rizosféricos.

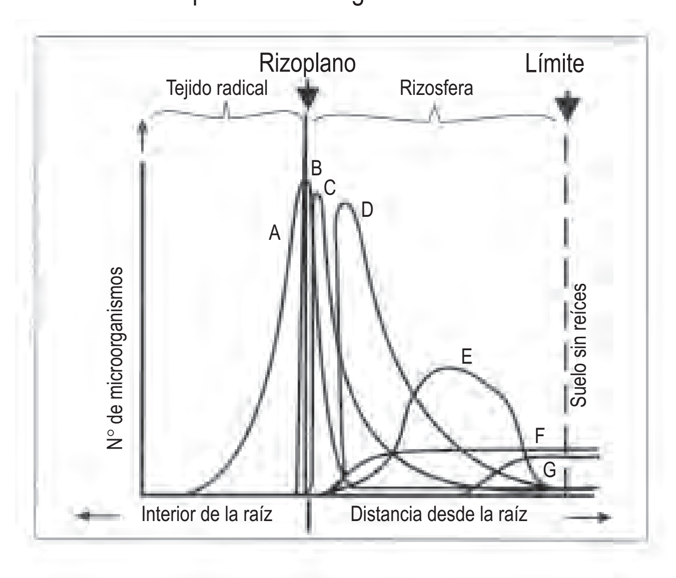


Figura 5 - Distribución de diferentes tipos de microorganismos en las raíces

Se aprecia que el:

- **tipo A:** crece en espacios intercelulares dentro de la raíz y su concentración cae abruptamente a niveles del suelo sin cultivo, inmediatamente fuera de la raíz
- **tipo B:** crece en el rizoplano y su densidad cae a niveles basales a muy corta distancia de la superficie radical y a cero a muy corta distancia dentro de la raíz (no es endofito).
- **tipo C:** organismo físicamente excluído del rizoplano por el tipo B), pero que emplea materiales orgánicos originados en la raíz o producidos por el organismo B), o ambos.
- **tipo D:** organismo física o químicamente excluído por los tipos B) y C), pero que emplea productos del C) o materiales complejos de la raíz pero no usados por B) o C) por su incapacidad de metabolizarlos o por represión catabólica en esos organismos por moléculas orgánicas más simples, de las plantas.
- **tipo E:** utiliza productos secundarios de organismos rizosféricos, pero en desventaja competitiva con respecto a los tipos B, C y D y por lo tanto es incapaz de competir por moléculas originadas en las raíces
- **tipo F:** microorganismos típicos del suelo, excluidos físicamente de los ambientes sobre o cerca de las raíces, pero resistentes a productos o actividades de los organismos rizosféricos (antibióticos, quelantes del hierro, etc.)
- **tipo G:** microorganismos generales del suelo excluidos de la rizosfera por actividades o productos de los otros tipos.

Este esquema trata de representar el comportamiento de los microorganismos en los alrededores y dentro de las raíces, pero es evidente que alguna especie puede mostrar combinaciones de dos o más tipos de modelos de distribución.

Factores que afectan el efecto rizosférico

Los efectos sobre la población del suelo varían con la especie o la variedad del vegetal. Si las líneas de una especie varían en un solo gen, sus características rizosféricas pueden cambiar. La edad de la planta, su estado sanitario y vigor, el tipo y posición de la raíz, y por supuesto, el tipo de suelo y el ambiente afectan al efecto rizosférico.

Especie vegetal: algunas especies pueden estimular o suprimir a determinado grupo microbiano, aunque los casos de inhibición son menos frecuentes. Las leguminosas presentan, en general, mayor efecto rizosférico que los cereales, pero pocos estudios han relacionado este efecto con la naturaleza de los exudados radicales. Las diferencias pueden ser muy marcadas según la zona de la raíz que se estudie. Los organismos que requieren aminoácidos son más numerosos en la zona apical, por tratarse de una región que los libera.

Estado fenológico: el efecto rizosférico comienza a manifestarse desde la germinación de las semillas, por aporte de los microorganismos de la espermatósfera, los componentes de las envolturas del grano y por sus exudados. Para algunos autores la colonización se realizará principalmente a partir de los microorganismos del suelo, más que por los de la semilla.

Los máximos de estimulación se encontraron en la **floración y/o fructificación**, para luego declinar abruptamente cuando comienza la senescencia de las raíces. La composición de la microflora varía, proliferando los microorganismos que participan en la descomposición de los tejidos muertos. La población no se distingue ya de la natural del suelo y poco efecto residual se mantiene para el año próximo: el nuevo cultivo determinará la composición de su población rizosférica.

El efecto de edad de la planta puede enmascararse por interacciones con el ambiente. Así, variaciones en la intensidad luminosa afectan la exudación y por lo tanto la proliferación de hongos, por inhibición del grupo más sensible, las bacterias.

El cuadro 8 muestra el efecto de tres cultivos, en distintos estados fenológicos, sobre el conjunto de bacterias y actinomicetes. Se observa efecto estimulante en los últimos estados del desarrollo vegetal.

En el caso del trébol, el efecto rizosférico fue marcado en la floración, en el trigo menos significativo y similar en los estados vegetativo y de formación del grano, mientras que en la colza fue muy pronunciado desde la floración.

Suelo y ambiente: el efecto rizosférico es más pronunciado en suelos livianos, arenosos. En suelos desérticos, la rizosfera de la escasa vegetación colonizadora constituye el único ambiente en donde los microorganismos pueden desarrollarse y las relaciones R/S son allí muy importantes.

Cuadro8 - Efecto rizosférico sobre bacterias y actinomicetes (x10^6)

Cultivo	Estado fenológico	S	R	R/S
Trébol	vegetativo (4 hojas)	5,2	5,3	1,0
	vegetativo (6-8 hojas)	6,1	8,1	1,3
	floración	5,6	318,0	56,8
Trigo	germinación	5,2	6,8	1,3
	vegetativo	6,1	50,3	8,2
	grano en formación	5,6	52,0	9,3
Colza	vegetativo (6 hojas)	5,2	14,5	2,8
	floración	6,1	310,5	50,9
	fructificación	5,6	491,0	87,7

La incorporación de restos vegetales o animales, la fertilización, causan menos efectos en la rizósfera, la que manifiesta capacidad para mantener su equilibrio biológico.

La espermatósfera

Las semillas en germinación no realizan fotosíntesis pero ejercen efecto en el suelo vecino al movilizar sus reservas. Se considera que la espermatósfera es el origen de iniciación del efecto rizosférico de las raíces en desarrollo. A su nivel ocurren múltiples interacciones entre la planta, las poblaciones microbianas y el ambiente. Los productos liberados por |os granos son de naturaleza variable, según la edad, la especie y las características del medio (fuentes de C, N, sustancias biológicamente activas, como vitaminas, aminoácidos, otras inhibidoras). La liberación de exudados por las semillas es responsable de la alta mortalidad de las mismas a causa de la sulfatorreducción, cuando cultivos, como el de maíz, germinan en suelos ricos en sulfatos, compactados y saturados en agua. Otras actividades biológicas son estimuladas, como la solubilización de fosfatos, amonificación, celulolisis, y ciertas actividades enzimáticas.

La filósfera

Así como las raíces están rodeadas de una verdadera vaina de microorganismos rizosféricos, las hojas de las plantas presentan en su superficie poblaciones muchas veces importantes, de bacterias, levaduras, hongos filamentosos, y, en regiones tropicales húmedas, algas, líquenes y hepáticas. Este hábitat está sometido a humedades fluctuantes, ligadas a las precipitaciones. La transpiración de las hojas puede mantener un microclima algo más húmedo que el del aire.

El desarrollo de organismos es muy abundante en las hojas de las zonas tropicales húmedas, donde forman una película mucilaginosa de varias micras de espesor. La intensidad luminosa, la temperatura y la naturaleza de los exudados varían con el clima y la naturaleza de la planta.

Las poblaciones bacterianas de la filosfera son ricas en especies pigmentadas: *Flavobacterium, Xanthomonas, Pseudomonas*.

Levaduras, como la *Rhodotorula, Sporobolomyces*, poseen pigmentos rosados y son muy numerosas las especies de hongos. Entre las funciones microbianas más estimuladas en este hábitat se citan la amonificación, la fijación del N_2 y la lipolisis. La producción de antibióticos es frecuente en las poblaciones epifitas.

Los fenómenos que se desarrollan a nivel de la filosfera interesan mucho al fitopatólogo y al agrónomo, quienes tienen una puerta abierta a experiencias de inoculación con fijadores de N_2 o con microorganismos antagónicos de patógenos que protegen a la planta de las infecciones.

Efecto de los restos vegetales (efecto mantillo)

Contrariamente a las formaciones vegetales anuales que ejercen sobre la microflora del suelo una influencia limitada en el espacio y el tiempo, las formaciones vegetales perennes (bosques, praderas permanentes) afectan marcadamente a la microflora del suelo donde se desarrollan. Esta acción se ejerce a nivel de los exudados, como ya hemos analizado, por el aporte al suelo de residuos vegetales subterráneos (raíces) o aéreos (hojas, ramas) o de productos diversos arrastrados por el agua a través del follaje. Estos últimos aportes contienen elementos minerales (K, Na, etc.) y orgánicos: hidratos de carbono, aminoácidos.

Resulta difícil separar el efecto rizosférico del efecto de los restos sobre el suelo, puede observarse que, en el caso de bosques, los mantillos juegan un rol preponderante. Esta capa constituye para la microflora del suelo la principal fuente de:

- **energía y de elementos nutritivos** que en kg C/ha/año varían de 0,5 a 2 toneladas en bosques de zonas templadas y frías, para alcanzar 2 a 8 toneladas en bosques tropicales húmedos. Los mantillos en zona tropical son más ricos, además, en elementos minerales y en nitrógeno que los de las regiones templadas.

- **de sustancias estimulantes o inhibidoras:** como vitaminas y sustancias diversas aún no bien determinadas, que llegan al suelo. Inversamente, ciertos mantillos liberan productos tóxicos frente a especies bacterianas muy sensibles: bacterias nitrificantes autótrofas, fijadores del N_2, y otros organismos, como los celulolíticos. La toxicidad frente a los nitrificantes se manifiesta en formaciones forestales de la zona tropical húmeda o regiones templadas (bosques de pino silvestre, cedro, coníferas). Lo mismo puede ocurrir en ciertas praderas y bosques de coníferas, de la zona templada. Las sustancias responsables serían esencialmente **fenoles o compuestos con radicales fenólicos:** ácido gálico, floroglucinol.

- **otros efectos: modificación del pH del suelo**: la vegetación puede elevar el pH de los horizontes superficiales, por concentración de sustancias básicas. Pero más frecuentemente, la vegetación acidifica el suelo, caso de bosques de coníferas. Si ésta no es excesiva, la microflora fúngica, que en conjunto es indiferente al pH, puede indirectamente ser estimulada, por reducción de la competencia de otros organismos. Si se bajan una o dos unidades de pH, se puede observar efecto depresivo en la actividad biológica, más marcado si se acompaña de sustancias tóxicas hidrosolubles

En resumen: la rizósfera, la espermatósfera y la filósfera son áreas donde se liberan materiales orgánicos que pueden alterar la diversidad microbiana e incrementar el número de microorganismos, la actividad microbiana y las interacciones entre los microorganismos con las semillas, las raíces y el suelo adyacente. La comunidad microbiana en la rizósfera puede afectar el crecimiento vegetal en forma benéfica, neutra o perjudicial, afectando la salud, vigor y productividad vegetal. Los desafíos implican comprender el funcionamiento de la interfase suelo-raíz, suelo-semillas, superficie de hojas, a los efectos de lograr dominar el funcionamiento de los microorganismos, incrementar el desarrollo vegetal y reducir los impactos de los sistemas de manejo del suelo en el ambiente.

Se requieren avances en: la identificación de los factores que controlan la colonización radical, una mayor comprensión de la ecología microbiana en estos ambientes, para lo cual las técnicas de la llamada Ecología Genética, resultan muy útiles, en la identificación y seguimiento de microorganismos en particular.

Las prácticas de inoculación con numerosos microorganismos que han logrado instalarse y actuar en la rizósfera, espermatósfera y en la superficie de las hojas, como los fijadores de nitrógeno libres y simbióticos, bacterias y hongos controladores de plagas vegetales, solubilizadores de fósforo, hongos micorrícicos, etc. demuestran que es posible dirigir esta colonización con éxito.

Bibliografía

Bazin, M. J., P. Markham y E. M. Scott **Population dynamics and rhizosphere interactions, en the rhizosphere.** 1990, J. M. Lynch (ed), Wiley Interscience, New York: 99-127

Dommergues, Y. y F. Mangenot, La rhizosphère, en: **Ecologie microbiènne du sol,** 1970, Dommergues, Mangenot (eds.), Masson et Cie., París: 549-594.

Frioni, L. **Ecología microbiana del suelo,** 1990, Depto. de Publicaciones de la Universidad de la República, Montevideo, 517 pp.

Kennedy, A. C. The rhizosphere and spermosphere. en: **Principles and Applications of Soil Microbiology,** 1998, Sylvia, Fuhrmann, Hartel y Zuberer (eds), Prentice Hall, Londres

Lynch, J. M., **The rizosphere**, 1990, Wiley & Sons, England.

Martens, R, Apparatus to study the quantitative relationships between root exudates and microbial populations in the rhizoshpere. 1982, Soil Biol. Biochem., 14: 315-317

Rovira, A. D.; R. C. Foster y J. K. Martin, Origin, nature and nomenclature of organic materials in the rizhosphere, en: **The soil-root interface**, 1979, Harley, J. L. y R. Scott Russell (eds.), Academic Press, Londres: 1-4

Shippers, B.; A. W. Bakker y P. A. H. Bakker, Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere micoorganisms and the effect of cropping practices. 1987, Ann. Rev. Phytopathol, 25: 339-358

Preguntas de repaso

1) Señale dos ejemplos de efectos: i) benéficos y ii) perjudiciales, de los microorganismos sobre las plantas y cómo los pondría en evidencia
2) Idem, pero efectos de los vegetales sobre los microorganismos
3) ¿Por qué es la rizosfera una región del suelo con actividad microbiana incrementada?
4) ¿Por qué resulta la espermatósfera otra importante área de estudio?
5) Rol de las distintas sustancias orgánicas liberadas en la rizosfera.
6) ¿Cómo podemos distinguir la rizosfera, el rizoplano y la superficie de las raíces?
7) ¿Mediante cuales mecanismos las poblaciones microbianas pueden tener carácter benéfico, neutro o perjudicial?
8) ¿Qué factores afectan la colonización radical?
9) Señale dos técnicas para evaluar el efecto del cultivo de cierta variedad de tomate sobre los microorganismos del suelo.

14 Interacciones entre microorganismos

En la naturaleza, las poblaciones microbianas raramente se presentan aisladas. En ciertos hábitats, como por ejemplo en la vecindad de las raíces, en restos de materia orgánica, en aguas o cuando se incorporan al suelo restos de cosechas, fertilizantes, etc., los componentes de la comunidad son afectados significativamente por sus vecinos. Dada la proximidad estrecha de los organismos cuando sus densidades son altas, las interacciones entre organismos son importantes en esos ambientes.

Son precisamente estas interacciones entre habitantes de una comunidad y las interrelaciones entre los organismos y su ambiente abiótico químico y físico, las que regulan la composición de la microflora y la microfauna de un ecosistema.

Se establece un **equilibrio dinámico**, resultante de las interacciones biológicas y no biológicas. Este equilibrio se mantiene en un ecosistema dado, y la capacidad para mantener la estabilidad de una comunidad en un medio ambiente variable es denominada **homeostasis.** Al cambiar las condiciones del medio, entran en juego mecanismos autorreguladores o reacciones homeostásicas para reestablecer las relaciones existentes previamente.

Dos o más poblaciones pueden interactuar con tres consecuencias:

Poblaciones	Efecto	Interacción
A ⟷ B	0	neutralismo
	+	sinergismo
	-	antagonismo

A pesar de la estrecha proximidad en que puedan encontrarse dos o más especies que coexisten en el espacio o en el tiempo, pueden no afectarse mutuamente. El **neutralismo** es evidente *in vitro* cuando las velocidades de crecimiento y las densidades finales de dos poblaciones son semejantes. La demostración del neutralismo *in vivo* es más difícil. Es probable que ocurra cuando las densidades de las poblaciones son bajas, el aporte de nutrientes abundante y son satisfechos los requerimientos para el desarrollo de las poblaciones, de modo que no interactúen para los nutrientes, el espacio, etcétera, pero cuando el ambiente comienza a modificarse por la actividad biológica o cuando el aporte de nutrientes comienza a disminuir, las especies comienzan a interactuar.

Se distinguen tres tipos de **asociaciones sinérgicas,** a pesar de que las líneas de demarcación no son siempre nítidas y están muy afectadas por el ambiente:

- **comensalismo** : un organismo se beneficia mientras que el otro no es afectado
- **protocooperación, simbiosis nutricional**, **o mutualismo**, en donde el beneficio es mutuo, sin llegar a presentar carácter obligatorio
- **simbiosis verdaderas,** en las cuales los integrantes se benefician en situaciones en que ninguno de ellos podría realizar una función vital o sobrevivir

Las **interacciones antagónicas** presentan un carácter perjudicial para una parte de la población e incluyen la:

- **competencia** por los nutrientes (C, N, S, P, etc.), el espacio, luz, O_2, CO_2

- **el amensalismo:** una especie es perjudicada por otra que libera sustancias químicas como ácidos orgánicos o minerales, toxinas, bacteriocinas, antibióticos, enzimas

- **predación**, que implica el ataque directo de una especie sobre otra, con la muerte de la presa

- **parasitismo,** por el cual un organismo se alimenta de células, tejidos o fluidos de otro organismo, usualmente mayor, llamado hospedante, el que es injuriado, pudiendo incluso morir

Interacciones sinérgicas

Comensalismo

Constituye una interacción muy común en la naturaleza, en donde los procesos de degradación de moléculas complejas son realizados por lo general por poblaciones mixtas (cadenas alimenticias), cada una de las cuales ofrece a las otras un sustrato más simple. El organismo que recibe el beneficio se denomina **comensal** y la relación es con frecuencia, pero no necesariamente, **casual**, ya que gran número de especies puede colaborar, existiendo poca especialización entre los asociados.

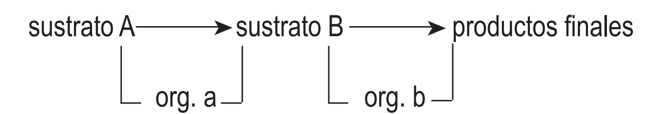
Algunos ejemplos implican una estrecha unión física entre ellos, en otros casos no se requiere proximidad entre los individuos. Ejemplos de esta asociación:

Modificación de un sustrato: una población convierte un sustrato no disponible para otra población en un producto que puede ser asimilado y usado como nutriente:

- bacterias celulolíticas y *Azotobacter* spp en suelos que han recibido aportes de restos vegetales

- *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, en medio rico en amonio

- degradación de polímeros como celulosa, almidón, quitina, sustancias pécticas, lignina, pesticidas: intervienen primero poblaciones **especializadas** que permiten el desarrollo posterior de otras que emplean moléculas más simples (cadena alimenticia).



- **Liberación de sustancias bióticas**: los factores de crecimiento son sintetizados por algunos microorganismos y su excreción permite la proliferación de auxótrofos (que los requieren pero no los pueden sintetizar). Así, muchos aislamientos a partir del suelo o aguas no crecen en los medios corrientes de laboratorio si no se los provee de ciertos aminoácidos, vitaminas, o bases púricas o pirimídicas. En el **laboratorio** se puede observar fácilmente este tipo de interacción: en un medio nutricionalmente inadecuado, las colonias de un organismo de interés se desarrollan en la vecindad de colonias de especies que excretan los nutrientes requeridos por la primera especie (colonias satélites).

org a ⟶ vitamina B ⟶ org b (comensal)

* En aguas: algas auxótrofas para numerosas vitaminas se asocian con bacterias heterotróficas productoras de vitaminas

* En el rumen, se da coexistencia de organismos exigentes y otros que producen y liberan factores de crecimiento (capítulo 18).

- **Remoción de factores inhibidores**: una especie metaboliza toxinas u otros factores inhibidores, permitiendo, entonces, la multiplicación de su asociado. Las variaciones del pH o del Eh, la remoción del O_2, la reducción de la presión osmótica, los cambios en los niveles de nutrientes por la actividad biológica, son causas de beneficio para el comensal

Ejemplos:

- organismo sensible a un biocida y otro que lo degrada

org. b

org. a ⟶ enzimas ⟶ sustrato ⟶ productos finales

antibiótico inactivado

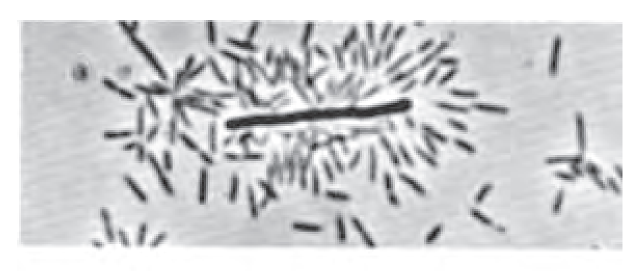
- aerobio y anaerobio dentro de un agregado en suelo aireado

- mesófilo y alcalinizante en ambiente ácido
- superficies adecuadas para la proliferación: un macro o microorganismo puede resultar una superficie adecuada para la colonización por el comensal, brindándole ventaja ecológica.
- es frecuente observar bacterias que se desarrollan sobre algas, adhiriéndose a los organismos fotótrofos **(ectocomensalismo)**.

Un organismo puede proveer hábitat favorable para su desarrollo a otro, el comensal no perjudica ni beneficia al organismo que lo alberga **(endocomensalismo)**. Estas relaciones derivan ocasionalmente hacia el parasitismo.

Como se observa, estas asociaciones son muy frecuentes en la naturaleza y explican la existencia de organismos exigentes en el plano nutricional en ambientes pobres, como en suelos o aguas.

En medios acuáticos, son muy importantes las asociaciones entre algas y otros microorganismos, como bacterias, actinomicetes y hongos, quienes estimulan el desarrollo de los fotótrofos por la excreción de factores de crecimiento, liberando CO_2, o aportando productos de la mineralización del nitrógeno, etc.



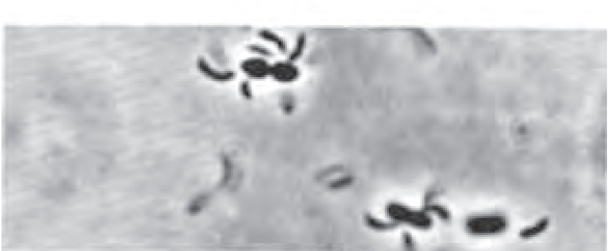


Figura 1- ComeΩΩnsalismo: adhesión de células de *Caulobacter* a *Bacillus* (arriba) y con *Azotobacter* (abajo), que usan materiales orgánicos segregados, en ambientes acuáticos.

Crecen lentamente y esta ventaja les permite competir con otros quimiheterótrofos en la naturaleza. Muchas veces se observan al microscopio células bacterianas completamente rodeadas de un ectocomensal, que se adhiere específicamente, en general en forma perpendicular a la célula (figura 1). Se fijan a organismos muy variados, como algas verdes y cianobacterias, diatomeas y bacterias no relacionadas, de cuyas excreciones se nutren.

Protocooperación

Estas relaciones involucran beneficio mutuo para dos o más especies y presentan carácter bastante laxo, es decir que la existencia de cada integrante de la asociación en un ambiente no requiere una especie particular, sino que muchos integrantes de la población pueden brindarle los requisitos para su crecimiento. Los organismos que interactúan bajo ciertas condiciones ambientales, pueden proliferar independientemente, en otras condiciones. Se las denomina también mutualismo no obligatorio, simbiosis nutricional o sintrofismo.

Se reconocen algunas categorías de protocooperación:

- síntesis y degradación de macromoléculas: polisacáridos como la celulosa, lignina, etc. son degradados por cultivos mixtos.
- un organismo provee una fuente de energía a su pareja y ésta le aporta algún nutriente esencial
- cada integrante de la pareja excreta un factor de crecimiento sin el cual el asociado no puede desarrollarse

A tiamina$^-$ riboflavina$^+$ B tiamina$^+$ riboflavina$^-$

Los organismos A y B pueden crecer juntos en ambientes pobres ya que cada organismo excreta el factor de crecimiento requerido por el otro. La figura 2 muestra el desarrollo de organismos aislados de la leche: en medio deficiente en fenil-alanina (aminoácido) y ácido fólico (vitamina), ni *Streptococcus faecalis* ni *Lactobacillus arabinosus* se desarrollan, ya que el primero requiere ácido fólico y el segundo fenilanina. El cultivo mixto permite el desarrollo de ambos.

- cada integrante puede aportar fragmentos de la molécula de un factor de crecimiento, como la vitamina B_1 o tiamina: A (tiazol$^+$ y piramidina$^-$) y B (tiazol$^-$ y pirimidina$^+$), la pareja sintetiza la **tiamina** formada por tiazol y pirimidina, requerida por ambos.

- un heterótrofo produce CO_2 para un alga, quien a su turno libera el O_2 necesario para el primero

- una población destruye una toxina que perjudica a su asociado y éste, libre del inhibidor, aporta un compuesto necesario para la especie

- *Azotobacter* y celulolíticos en ambientes pobres en nitrógeno y ricos en pajas. El primer organismo le brinda el nitrógeno fijado vía excreción y el segundo hidratos de carbono simples

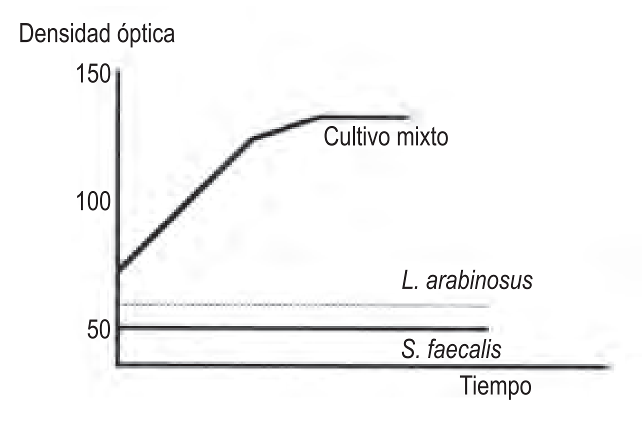


Figura 2 - Asociacación sinérgica entre *Lactobacillus arabinosus* y *Streptococcus faecalis*

El cuadro 1 señala la importancia de este tipo de asociaciones en biodigestores rurales, donde una sucesión de microorganismos asegura la degradación de la materia orgánica en anaerobiosis y la liberación final de metano (capítulo 21). Un grupo de organismos libera hidrógeno, necesario para el accionar del otro grupo, que lo consume. A su vez, el segundo grupo mantiene concentración baja de H_2 y promueve la fermentación de los ácidos grasos y la producción de H_2 que regula el funcionamiento del biodigestor. Esta asociación se denomina también sintrofia.

Cuadro 1- En biodigestores anaerobios (sintrofismo)

Syntrobacter	ác. propíonico $\longrightarrow$	acetato + CO_2 + H_2
Methanospirillum	$4H_2 + CO_2$ $\longrightarrow$	$CH_4 + 2\ H_20$

Simbiosis

Involucran relaciones bastante duraderas en las cuales dos o más especies viven en inmediata proximidad y obtienen beneficios mutuos de su interacción. En un hábitat dado, la simbiosis resulta casi siempre de carácter **obligatorio**, para que los simbiontes realicen sus funciones vitales. Algunos biólogos emplean el término **mutualismo** para referirse a estas asociaciones y reconocen las **simbiosis mutualísticas**, en donde ambos integrantes se benefician, y las **simbiosis parásitas**, en las cuales un integrante se beneficia pero el otro no se afecta, o a veces sufre perjuicio más o menos severo (no usaremos en este texto esta acepción). Consideraremos a las simbiosis cuando al menos un integrante de la asociación obtuvo algún beneficio.

Los límites de separación de ambas resultan a veces difíciles de determinar. Además, el ambiente puede ejercer profundos cambios en las relaciones, de modo que una asociación que comenzó siendo mutualística puede volverse parásita, o viceversa.

Algunas simbiosis involucran microorganismos entre sí, otras incluyen microorganismos con insectos, plantas y animales superiores. Analizaremos solamente aquellas entre microorganismos, muchas veces no distinguibles fácilmente por el tamaño submicroscópico de la mayoría de los integrantes.

- **líquenes**, la simbiosis más conocida entre un alga o una cianobacteria y un hongo: ficobionte y micobionte. Los líquenes son considerados nuevos organismos con estructura externa diferente a la de los simbiontes, con exis-

tencia independiente y funciones fisiológicas propias. La simbiosis ocurre bajo condiciones adversas para cada uno de los integrantes: bajo contenido en materia orgánica, temperaturas desfavorables, sequedad, etc.: el hongo obtiene materia carbonada de la fotosíntesis del alga, y ésta se beneficia con el aumento de la superficie de absorción y del agua retenida en la hifas (figura 3).

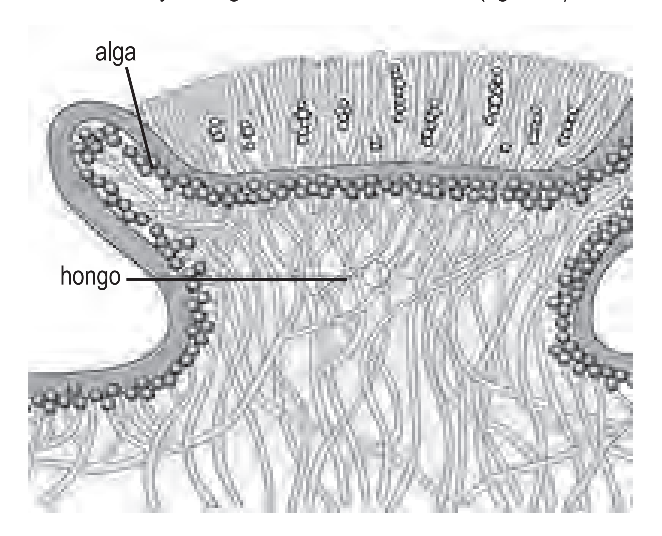




Figura 3- Líquenes. Arriba: partes de un líquen, hifas fúngicas y componente algal, abajo: liquen sobre soporte sólido.

Muchos líquenes poseen una cianobacteria fijadora de N_2, constituyéndose en importantes colonizadores de suelos pobres, desérticos, o muy fríos.

- **levaduras** como *Lypomyces starkey* estimulan el crecimiento y fijación del N_2 de *Beijerinckia indica*. Se describe esta asociación como una simbiosis.

- **algas y protozoarios**: algunos fotoautótrofos viven y se mantienen como simbiontes en los protozoos, de los cuales obtienen nutrientes y un ambiente protector, incluso algunos no pueden desarrollarse fuera del hospedante. Una pequeña bacteria denominada *Kappa* ha sido descripta como endosimbionte de un protozoo *Paramecium aurelia*, es requerida para su multiplicación y ha sido liberada del hospedante por métodos físicos o químicos.

- **protozoarios flagelados** (*Cyanophora y Peliana*) y el ameboide *Paulinella* han sido descriptos en asociación con una **cianobacteria** denominada *Cyanellae*, la cual se mantiene perfectamente regulada en el protozoo, con divisiones celulares balanceadas: el hospedante alberga dos células de la cianobacteria (sin pared) que en la división se reparten en cada célula hija.

El **simbionte** favorece a su pareja por varios mecanismos:

- **aumento de la velocidad de crecimiento**: el protozoo con el alga específica crece más rápidamente que sólo. Estimulación de la actividad metabólica (respiración, etc.)

- **fuentes de C por la fotosíntesis**: las algas en simbiosis en líquenes, o en protozoos o invertebrados acuáticos o con plantas, fotosintetizan en exceso para sus necesidades y satisfacen así los requerimientos de sus asociados. La capacidad de muchos paramecios para desarrollarse en medio inorgánico en la luz cuando están asociados a un alga clorofícea, explica esto

- **conversión de nutrientes no disponibles** para el simbionte en disponibles, por ejemplo los celulolíticos en el rumen, protozoos en el tracto digestivo de termites, que se alimentan de los productos de las fermentaciones microbianas

- **generación de CO_2 para la fotosíntesis**, o la producción de O_2 para el simbionte por acción de la actividad fotosintética.

- **provisión de factores de crecimiento**, utilización de metabolitos tóxicos, protección contra altas intensidades luminosas, desecación, parásitos, son otros de los mecanismos involucrados, en las asociaciones simbióticas.

Como vimos, las **simbiosis** varían según los autores por el grado de unión entre los participantes (ecto o endosimbiosis), el beneficio logrado, el grado de dependencia (simbiosis facultativa-obligada) y la duración de la misma: en general involucran la mayor parte de la vida de los participantes.

La elección de la pareja no es en general un hecho casual, se reconoce cierta especificidad, distinguiéndola de la protocooperación. La asociación es eminentemente exitosa y esto explica su amplia distribución en ecosistemas marinos, en el cuerpo de animales, en hojas, raíces, suelos, aunque algunos autores reconocen simbiosis con efectos negativos (parasitismo).

Interacciones antagónicas

Al introducir un inoculante biológico, con rhizobios, *Frankia,* bacterias solubilizadoras de fosfatos, en ambientes densamente colonizados como el suelo, es frecuente observar que la población no logra sobrevivir y desaparece. Como vimos, cada microorganismo requiere de un conjunto de condiciones nutricionales y ambientales que le permiten desarrollarse.

Las interacciones antagónicas pueden explicar la desaparición o disminución significativa de algún organismo de interés cuando las condiciones físico- químicas son las adecuadas.

Competencia

En ambientes naturales, suelo, aguas, los sustratos energéticos y los nutrientes son por lo general limitantes como para mantener altas poblaciones microbianas, las que interactúan compitiendo por los sustratos: se habla de **competencia nutricional**. Si, excepcionalmente, el ambiente es rico en nutrientes, la competencia puede ejercerse por el espacio, la luz, etcétera.

Este tipo de interacción ejerce un profundo impacto en la sucesión de microorganismos, en la selección natural y en la composición de las comunidades microbianas. Podemos hablar de competencia interespecífica o intraespecífica, según se realice entre organismos de la misma o diferente especie.

La figura 4 esquematiza la competencia en medio líquido entre dos bacterias. El mejor competidor es en general el que presenta menor tiempo de generación, se multiplica a la misma velocidad en cultivo puro y en mixto, aunque su densidad final es frecuentemente menor en cultivo mixto. El otro organismo crece a igual velocidad en cultivo puro o mixto, pero su velocidad de crecimiento disminuye cuando la primera especie metaboliza el nutriente limitante.

En el suelo, uno de los principales factores limitantes es el **carbono**, y la competencia por este elemento se hace evidente cuando la densidad de la población es alta. Al agregar sustancias carbonadas fácilmente metabolizables, se observa el levantamiento de la inhibición de la población de débil poder competitivo.

El cuadro 2 muestra el efecto del agregado de glucosa y nitrato de potasio en la competencia entre un hongo y una bacteria, en suelo neutro. Se aprecia que la competencia fue al inicio por el carbono, pero cuando éste es aportado se manifiesta la limitante del otro nutriente esencial, el nitrógeno.

En la figura 5 se esquematiza el desarrollo del hongo en el caso en que el carbono asimilable es suficiente. Como se observa, en general aparece la deficiencia por el nitrógeno. El modelo experimental es suelo estéril inoculado simultáneamente con el hongo y la bacteria.

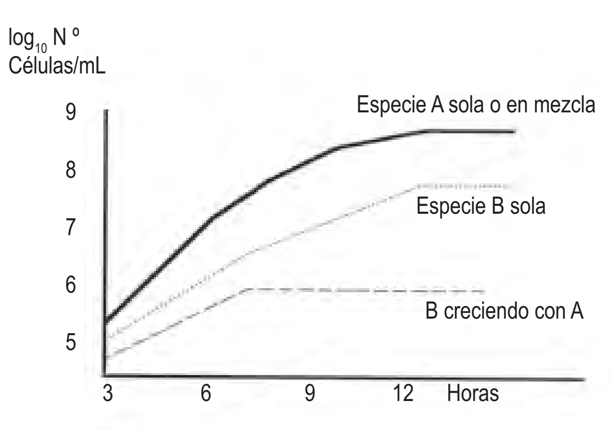


Figura 4 - Modelo de competencia entre bacterias en medio líquido

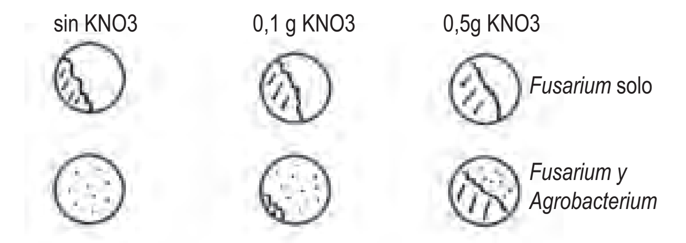


Figura 5- Competencia por el nitrógeno entre un hongo y una bacteria

Cuadro 2 - Efecto de aportes de glucosa y nitrato en la asociación *Agrobacterium radiobacter y Fusarium oxysporum*

Glucosa%	KNO3%	*Fusarium* solo	*Fusarium + Agrobacterium*
0	0	2,8	1,2
	0,25	2,9	1,0
	0,50	3,1	0,8
	2,5	2,8	2,9
1	0	5,5	2,1
	0,25	5,2	1,9
	0,50	5,4	1,9
	2,5	5,4	5,0
3,0	0	5,3	1,8
	0,25	5,2	1,8
	0,50	5,4	2,0
	2,5	5,2	5,2

Los competidores más efectivos de este hongo fitopatógeno son organismos con requerimientos nutritivos simples.

La capacidad de un organismo para **competir** está gobernada por una serie de factores:

- **alta velocidad de crecimiento**: las especies que usan los nutrientes limitantes rápidamente poseen sin duda ventajas sobre las de crecimiento lento

- **tolerancia a factores abióticos**: la facilidad de crecer en condiciones extremas, en bajas o altas temperaturas, altas intensidades luminosas, bajos niveles de humedad, brindan al organismo ventaja ecológica indudable

- **tolerancia a fluctuaciones del ambiente**: de temperatura, niveles hídricos, intensidad luminosa, etc.

- **capacidad de multiplicarse a bajas concentraciones de nutrientes limitantes**, propiedad de pocas especies, como algunas algas que crecen bien a concentraciones muy bajas de nitratos o fosfatos, y hongos que aparecen como contaminantes en medios sin N combinado y que pueden usar trazas de nitrógeno orgánico contenidas en los productos químicos.

- **eficiencia en el uso de nutrientes limitantes**: son favorecidos aquellos organismos que pueden sintetizar citoplasma con niveles bajos de nutrientes asimilables

- **requerimientos de factores de crecimiento**: en ambientes pobres, organismos prototrofos poseerán ventaja frente a un auxótrofo para estas sustancias

- capacidad para sintetizar y almacenar sustancias de reserva y emplearlas cuando el aporte de nutrientes disminuye

- capacidad de desplazarse hacia áreas en donde el nivel de nutrientes limitantes es mayor (quimiostasis)

Cuando materiales orgánicos se incorporan al suelo o aguas, los primeros colonizadores son en general **las bacterias con alta actividad metabólica y los hongos**, con esporas que germinan fácilmente.

En ambientes acuáticos, es posible observar competencia por la luz; la masa de fitoplancton limita la difusión de las radiaciones. El CO_2 y el O_2, poco soluble en el agua, provocan también fenómenos competitivos entre heterótrofos aerobios, sobre todo en aguas contaminadas con residuos orgánicos.

En regiones áridas, la **competencia por el agua** ejerce importante rol en la sucesión de especies. La **competencia por el espacio** resulta más difícil de demostrar. Además, las observaciones en microscopia electrónica de barrido en finos cortes de suelo, muestran la existencia de amplias zo-

nas sin colonizar, indicando que aparentemente habrían escasas limitaciones espaciales para el desarrollo de microorganismos. Aunque esta limitación podría ocurrir a nivel de microporos, donde una pequeña partícula de materia orgánica estimula la proliferación de células y micelio fúngico que puede obstruir rápidamente el microhabitat.

Este tipo de interacción antagónica es una de las más difíciles de demostrar en comunidades naturales y se recurre a modelos con suelo estéril y la inoculación simultánea de los organismos sospechosos de interactuar.

Amensalismo

Resulta de la producción por una especie microbiana, el **antagonista**, de sustancias:

- **inhibidoras** (microbiostáticas)
- **tóxicas (microbicidas**) con o sin lisis (**microlíticas**) de células o filamentos de especies muy próximas.

Las sustancias pueden ser de:

- **baja especificidad**: actúan sobre gran número de microorganismos, como por ejemplo, los ácidos minerales u orgánicos, alcoholes, detergentes. Son efectivas a altas concentraciones. Inhibidores inorgánicos como el H_2O_2, NH_4^+, NO_2^-, CO_2, H_2S, NO_3^- son producidos por procesos biológicos y pueden alcanzar concentraciones que llegan a ser inhibidoras o tóxicas para especies sensibles. Compuestos orgánicos como los ácidos grasos, alcoholes, son sintetizados por una multiplicidad de especies y pueden ser inhibidores, en ambientes donde su degradación es lenta (ácido láctico en alimentos).
- **altamente específicas**, como en el caso de antibióticos, sulfas, toxinas, enzimas, las que actúan a muy bajas concentraciones.

Antibióticos

Son metabolitos secundarios, productos de desecho liberados por bacterias, actinomicetes, hongos, que juegan importante rol en la lucha biológica en ambientes naturales (capítulo 4).

Brindan supremacía a la especie productora y contribuyen a determinar el tamaño de una comunidad, gobernando además la sucesión de especies. Estas interacciones explican la eliminación de ciertos patógenos para el hombre y vegetales, el control de hongos fitopatógenos cuando se incorpora al suelo restos orgánicos, o la desaparición de bacterias extrañas que llegan al rumen.

Detección: cuando una suspensión diluida de suelo o muestras de agua se siembran en la superficie de medio rico, muchas de las colonias aparecen rodeadas de un halo de inhibición, donde no crece otro organismo (figura 6) (Madigan *et al*., 2000). La colonia produce una sustancia difusible en el agar, presumiblemente un antibiótico, que inhibe o mata a especies sensibles a concentraciones muy bajas.

Se confirma esta presunción aislando el microorganismo y sembrándolo en otra caja en forma de línea recta. Luego de 2-3 días se siembran perpendicularmente a estas líneas, varios organismos para probar su especificidad. La supresión del crecimiento a distancias variables de la cepa productora refleja la sensibilidad frente a la sustancia inhibidora (figura 7) (Madigan *et al*., 2000).

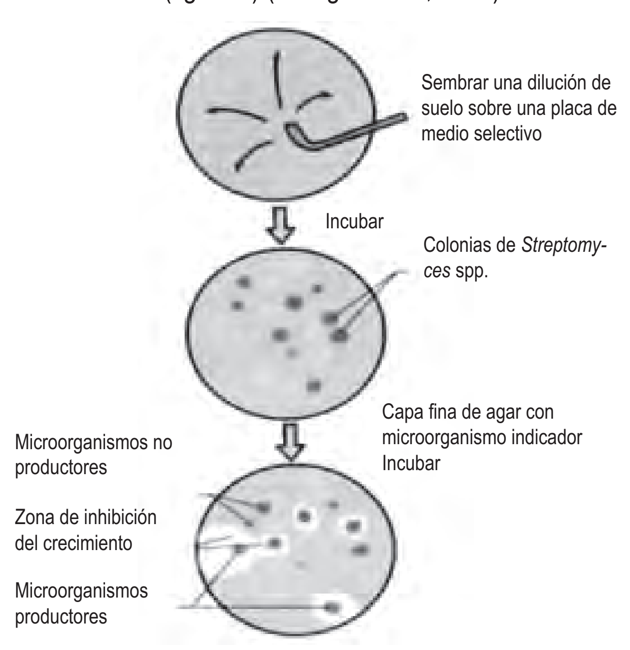


Figura 6 - Microorganismos productores de antibióticos evidenciados en medio de cultivo

Rol en la naturaleza: durante mucho tiempo se sostuvo que los antibióticos eran un fenómeno de laboratorio ya que las concentraciones requeridas para dañar a otro organismo se alcanzaban raramente en la naturaleza.La sustancia debe desplazarse desde el organismo productor hacia la especie sensible, pudiendo ser degradada o adsorbida. Estas controversias han sido superadas y se piensa que los antibióticos juegan un rol muy importante en el **equilibrio biológico** del suelo, siendo sobre todo activos a nivel de microagregados, donde la densidad microbiana puede ser muy alta y las células están en estrecha proximidad.

Modo de acción: su composición química y modo de acción son muy variados: actúan a nivel de membranas, pared, ribosomas, interfiriendo metabolismos bioenergéticos o sintéticos (actividad respiratoria, síntesis proteica, etc.). Es frecuente la aparición de **resistencias** entre las especies sensibles, quienes mutan o cambian la estructura sensible de modo que el antibiótico no la reconoce, o sintetizan enzimas que rompen o desnaturalizan al antibiótico, como la **penicilinasa**. En general, la resistencia está codificada en plásmidos y puede perderse con éstos, que a su vez pueden transferirla a organismos sensibles.

Enzimas extracelulares producidas por muchos microorganismos que ocasionan la lisis de organismos sensibles. La **quitinasa**, producida por bacterias y actinomicetes lisa las paredes de hongos al actuar sobre la quitina. La **glucanasa** actúa sobre la microflora y microfauna (nemátodos).

La competencia y la antibiosis explican el fenómeno de **micostasis** o inhibición de la germinación de esporas fúngicas. La **fungiostasis** es la inhibición, sin llegar a la muerte, de hongos (hifas, conidios, esclerocios, ascosporas). Se han reconocido algunas toxinas, antibióticos y compuestos volátiles como responsables de la inhibición de la proliferación de estas estructuras, aun en condiciones de abundancia de nutrientes. En ciertas situaciones este fenómeno puede resultar beneficioso para muchos patógenos vegetales, ya que si germinaran cuando su hospedante no está próximo, serían eliminados por la población nativa por competencia o amensalismo.

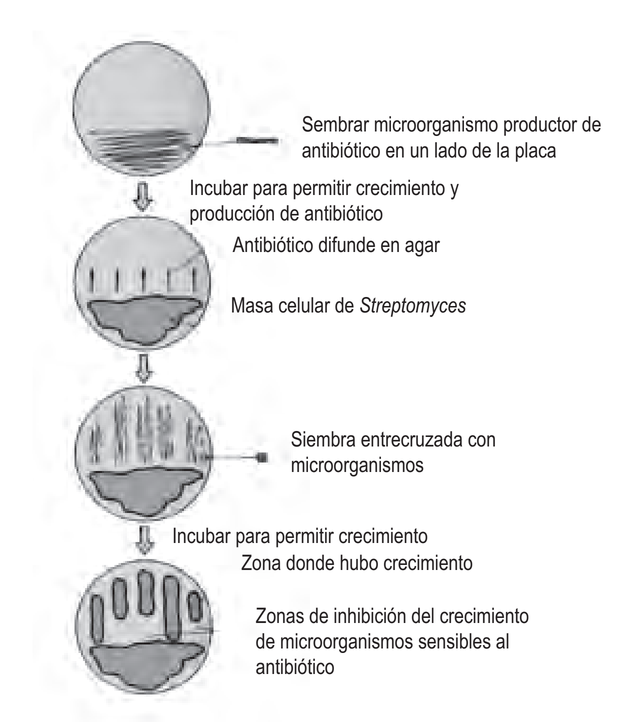


Figura 7- Espectro de acción de un antibiótico

Parasitismo

Un **parásito** es un organismo que se nutre a partir de células, tejidos o fluidos de otro organismo, usualmente mayor, llamado **hospedante**, el que generalmente es injuriado en el proceso. El parásito es dependiente en alto grado del hospedante, a expensas del cual se nutre y con el que se mantiene en contacto físico y metabólico íntimo durante considerable fracción de su vida. Muy pocos organismos están libres del ataque de parásitos microbianos. Resulta muchas veces difícil determinar las líneas de demarcación entre parasitismo e interacciones relacionadas, sobretodo la predación y el parasitismo, ya que ambos implican beneficio para unos y perjuicio para otros organismos.

Numerosos parásitos mantienen contacto prolongado y se alimentan por largo período de su hospedante y pueden atacar un rango estrecho de organismos. Hay especies que viven independientemente, como saprofitas y en ciertas oportunidades como parásitas, son los **parásitos facultativos.** Los **obligados**, por el contrario, deben vivir en las células, tejidos o fluidos de un organismo durante gran parte de su ciclo de vida.

Se distinguen los:

endoparásitos, que habitan dentro de un organismo, como los bacteriófagos, los actinófagos, etc., y otros microorganismos que viven dentro de hongos, algas, etc. y los

ectoparásitos que se localizan externamente en sus hospedantes, menos frecuentes entre microorganismos.

Una pequeña bacteria, de forma de vibrio, llamada *Bdellovibrio*, es parásita obligada de bacterias Gram negativas, entre ellas rhizobios, llegando incluso a su lisis. Su ciclo de vida es muy particular: se desplazan a gran velocidad, colisionan con las células que van a atacar por su extremo no flagelado y un orificio en la pared producido por enzimas permite al parásito penetrar, el que se ubica en el espacio entre pared y membrana (figura 8) (Prescott *et al*., 1999). La rotación permanente ayuda a debilitar la pared.

La membrana no es atravesada por el parásito pero se vuelve porosa y la célula se lisa. En la superficie de cajas de Petri con la especie hospedante, *Bdellovibrio* forma placas líticas, similares a las producidas por infección por fagos.

No han sido descriptos muchos parasitismos entre bacterias.

Los **hongos** sufren el ataque de numerosos parásitos, sobre todo de otros hongos en estructuras como clamidoesporas, esclerocios, oosporas de especies de *Penicillum, Rhizoctonia, Thrichoderma, Glioclodium*. Muchas especies sobreviven por su alta velocidad de reproducción, aunque las esporas pueden sufrir graves daños cuando son atacadas durante largos períodos por los parásitos.

Muchos hongos pueden penetrar en líquenes, afectando a los componentes de la asociación.

Los **protozoos** son parasitados también por varios tipos de bacterias y algunos hongos, llegando a veces a su lisis, por digestión de las paredes celulares.

En el parasitismo actúan enzimas extracelulares o antibióticos provocando **heterolisis**, o bien puede ocurrir una **autolisis,** por enzimas producidas por la propia célula o hifa parasitada.

El agregado de materia orgánica promueve la germinación de esporas y cuerpos en reposo, se favorece el desarrollo de las hifas, las que son atacadas más fácilmente por los antagonistas en el suelo, contribuyendo a la declinación de la infección por el fitopatógeno (**lucha biológica).** Asi, clamidosporas de *Fusarium solani* se lisan en suelos enriquecidos con quitina y laminarina, al estimularse el desarrollo de bacterias y actinomicetes quitinolíticos.

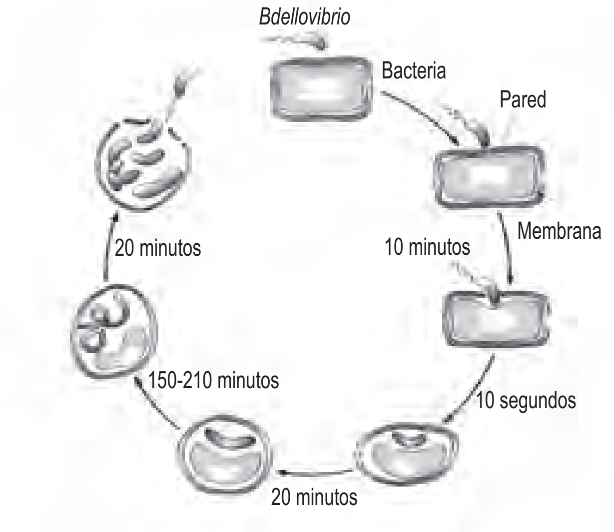




Figura 8- Parasitismo por *Bdellovibrio*. Arriba, esquema del proceso en una bacteria gram negativa. Abajo: microscopía electrónica de la bacteria y su parásito

Fagos: son los más conocidos parásitos de las bacterias, actinomicetes, cianobacterias, que pueden causar su lisis o lisogenizarlas al incorporarse a su ADN (capítulo 5).

Algunos virus son muy específicos, otros presentan un carácter más polivalente. A pesar de ser aislados de la mayoría de los suelos agrícolas, es improbable que sean los responsables de la desaparición de inóculos importantes de bacterias como rhizobios, cianobacterias, etc. Los virus que atacan hongos han sido estudiados, aunque se conoce menos su distribución en la naturaleza.

Predación

En este antagonismo el período de contacto es generalmente corto y la presa es muerta y digerida rápidamente. El **predator** vive, por lo general, libre, es mayor en tamaño que su presa y presenta menor especificidad en sus hábitos alimenticios.

Constituye una de las más dramáticas interacciones entre microorganismos en la naturaleza. Las bacterias son los organismos más expuestas al ataque de predatores, sobre todo protozoos, algas, hongos. El predator exhibe, por lo general, hábitos alimenticios **fagotróficos**, ingiriendo organismos vivos, a pesar de que algunos predatores lisan la presa y asimilan sólo los constituyentes solubles. Muchos protozoos viven toda su vida como fagotrofos, alimentándose de millones de bacterias por cada ciclo celular. La presa, sin embargo, no desaparece completamente, existe un equilibrio dinámico: el cambio en un grupo conduce a cambios cuali y cuantitativos en el otro y la población bacteriana atacada estimula su metabolismo y se divide más rápidamente, evitando en muchos casos su total extinción.

Muchas bacterias son resistentes a la predación, excretando toxinas inhibidoras de los protozoos, pigmentos o formando estructuras más resistentes a condiciones adversas y a la predación, como los **cistos**. La habilidad de la bacteria para mantener sustanciales poblaciones depende de su constante multiplicación en presencia del protozoo, por lo que ciertas bacterias no se reducen por los protozoos debajo de cierta densidad crítica, en el suelo y en medio líquido.

Existe evidencia de que los protozoos predatores aceleran procesos bioquímicos, incluyendo la descomposición de la materia orgánica, como consecuencia del hecho de que los protozoos evitan que las bacterias alcancen un número muy grande que resultaría autoinhibitorio. Se las mantiene, además, en estado prolongado de alta actividad metabólica.

Los protozoos pueden predar también a pequeñas algas, hongos, a pesar de que en este caso la presa es de mayor tamaño. Se piensa que los protozoos consumen bacterias si éstas están suficientemente próximas, de modo que la energía ganada en la predación es mayor que la requerida para predarlas. Cuando el número de bacterias cae a valores en los que la energía requerida por el protozoo para encontrar a su presa es igual o mayor que la que obtienen como alimento, entonces el protozoo cesa de predar, y se reproduce.

Como vimos, las interacciones **antagónicas** pueden conducir a una disminución importante e incluso al fracaso de prácticas agrícolas, como la inoculación de semillas y el suelo con organismos de interés en la fijación del N_2, solubilización de fosfatos, control biológico de microorganismos fitopatógenos, etc. La predación se encuentra entre las causas más importantes.

En resumen: las relaciones tanto benéficas como antagónicas entre microorganismos permiten explicar hechos aparentemente contradictorios, como son la presencia de microorganismos exigentes nutricionalmente en ambientes pobres, como el agua de mar u océano, a supremacía de ciertos agentes en situaciones desfavorables, el control biológico que se ejerce sobre microorganismos patógenos o deletéreos de plantas. Los suelos contienen una enorme diversidad de poblaciones microbianas y aun ignoramos muchos de los factores que controlan la composición de esas poblaciones.

Bibliografía

Atlas, R. M. y R. Bartha, **Microbial Ecology: Fundamentals an Applications**. 3ª ed., 1993, Benjamin/Cummings, Publishing Co. New York

Bottomley, P. J. Microbial Ecology, En: **Principles and Applications of Soil Microbiology,** 1998, Sylvia, Fuhrmann, Hartel y Zuberer: (eds), Prentice Hall, Londres

Madigan, Martinko, Parker. **Brock, Biología de los microorganismos**. 2000. Prentice Hall International.

Killham, K. **Soil Ecology**. 1994, Cambridge University Press. Cambridge, Londres

Prescott, Harley, Klein. **Microbiología**, 1999, Mc Graw-Hill Interamericana

Preguntas de repaso

1) ¿Cómo se explica la presencia de microorganismos exigentes nutricionalmente en ambientes pobres como el agua del océano?
2) ¿A qué se denomina comensal? Explique la participación de estos microorganismos en el proceso de degradación de macromoléculas por un consorcio microbiano?
3) ¿Por qué no son tan comunes las asociaciones simbióticas entre procariotas? Describa alguna
4) Al introducir un microorganismo en un suelo, éste puede desaparecer. Analice las causas de origen biológico y explique cómo podría determinar la causa real de este fenómeno
5) ¿Por qué un microorganismo puede llegar a producir un antibiótico?
6) ¿Cual es el mayor problema que enfrenta hoy día la industria farmaceútica?

15 Fijación biológica de N_2 en la rizosfera y en asociaciones nodulares

Fijación de N_2 en la rizosfera

La **eficiencia de la fijación** de organismos heterótrofos evaluada en medios de cultivo estáticos, es baja: **10 a 50 mg N fijado/g sustrato carbonado consumido.** Así, para fijar 100 kg N/ha/año se requeriría el metabolismo de aproximadamente 10 toneladas de materia orgánica, muy difícil de reunir en suelos sometidos a agricultura tradicional.

La fijación biológica del nitrógeno (FBN) es favorecida en ambientes como la **rizosfera**, región del suelo donde la actividad microbiana es modificada por la presencia de las raíces, la **filosfera,** superficie de las hojas y la **espermatosfera,** zona del suelo afectada por la presencia de semillas y granos. (capítulo 13).

La actividad de los diazotrofos es más eficiente en estos ambientes por:

* **los aportes de sustratos carbonados a partir de los productos de la fotosíntesis** que actúan como esqueletos carbonados y fuentes de energía

* **el microambiente con baja pO_2,** que permite el accionar de la N_2asa

* **la transferencia de los productos de la fijación** (aminoácidos, ureídos, proteínas) fuera de la zona de fijación, hacia las hojas, frutos, evitando así los efectos inhibitorios sobre el proceso.

Desde el primer informe sobre la estrecha asociación entre *Azotobacter paspali* y ecotipos tetraploides de *Paspalum notatum* de la variedad batatais realizado por el grupo de Döbereiner al comienzo de los años 70, en Brasil, numerosos trabajos señalan estimulación en la rizosfera de cultivos de interés económico, como cereales, gramíneas forrajeras, por especies de *Azotobacter, Beijerinckia*, *Azospirillum, Bacillus, Clostridium,* etc. (Döbereiner, Pedrosa, 1987; Döbereiner *et al*, 1992).

Se reconocen varios mecanismos de promoción del crecimiento vegetal por estos organismos:

- **fijación biológica del N_2**
- **liberación de fitohormonas y estimulación de la excreción de las mismas por la raíz colonizada**
- **protección frente a microorganismos fitopatógenos**

En las décadas del 70 y del 80 se afirmaba que la FBN era la principal causa de estimulación del crecimiento vegetal, pero las determinaciones de actividad de la nitrogenasa no evidenciaron niveles muy altos en rizosferas de cereales y otros cultivos y los ensayos con N^{15} señalaron incrementos entre 10- 50 $kgN.ha^{-1}.año^{-1}$.

La contribución de los otros mecanismos señalados es reconocida y evaluada en los ensayos de inoculación.
Otras bacterias han sido descriptas en la bibliografía como estimuladas en la rizosfera: *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. en suelos de arroz y trigo; bacterias sulfatorreductoras, en suelos inundados de arroz; *Bacillus y Enterobacter cloacae* en pasturas de *Agrostis tenuis*, trigo y festuca. Especies de *Azotobacter* fueron estimuladas en cultivos de maíz y trigo y *Azospirillum* en pasturas naturales de la Patago-

nia, Argentina. Se determinó efecto estimulante de la rizosfera de sorgo, maíz, mijo perla y mijo común sobre *Azotobacter, Azospirillum y Clostridium* en el campo, sobre todo en los dos períodos más críticos en N para los cultivos: floración y grano al estado lechoso.

Se postula la existencia de **lectinas** que unirían específicamente los espirilos a los pelos capilares de ciertas gramíneas. En presencia de nitrógeno combinado, la bacteria sólo se asocia al mucigel del ápice y a células epidérmicas no diferenciadas.

Ecología de las asociaciones rizosféricas

A diferencia de las asociaciones nodulares, estas asociaciones rizosféricas, llamadas también simbiosis asociativas o **rizocenosis**, se encuentran muy afectadas por las fluctuaciones del ambiente, que impide muchas veces una fijación acorde a las necesidades del vegetal. La figura 1 presenta la compleja serie de requerimientos que deben reunirse para favorecer la fijación del N_2 en la rizosfera de arroz.

Algunos de los factores que afectan la fijación del nitrógeno a nivel rizosférico son:

- **Fotosíntesis**: la provisión de hidratos de carbono y otras sustancias a nivel radical está gobernada por el tipo y la intensidad de la fotosíntesis. Experiencias con cultivos evidencian abrupta caída de la actividad nitrogenasa cuando las plantas se sombrean, o se corta la parte aérea; aunque se ha observado en algunas experiencias otro pico en horas de la noche, a expensas de las reservas carbonadas.

- **Factores físicos:** como es de suponer, una excesiva humedad o extrema desecación afectarán de gran manera a este proceso. La temperatura es otro de los factores que inciden limitando el proceso cuando los umbrales térmicos son muy bajos o muy altos. Rangos entre 18 y 30ºC se citan como óptimos para cultivos en zona templada.

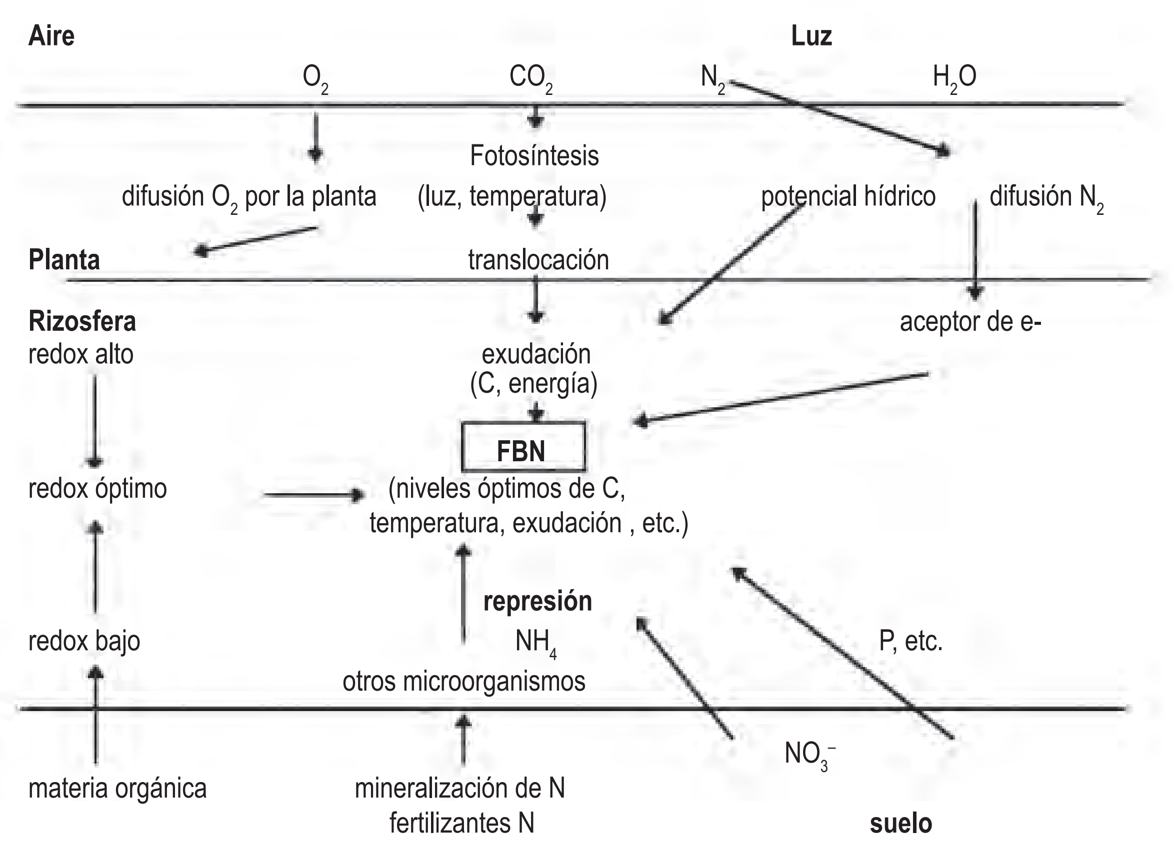


Figura 1- Fijación biológica de N_2 en la rizosfera de arroz y efecto de factores edáficos, climáticos y del cultivo

- **Nutrientes:** el nivel de N combinado fácilmente asimilable en el suelo (amonio y/o nitrato) afecta este proceso. Se tiende a la selección y empleo de mutantes de diazotrofos resistentes a altos niveles de N mineral y que además excreten rápidamente el amonio fijado. Una ligera fertilización en la siembra (**10-30 kg N/ha)** es empleada en gramíneas, en suelos pobres. El establecimiento del cultivo estimula la FBN rizosférica que contribuye con parte de la demanda en nitrógeno. Fósforo, molibdeno, hierro, inciden en el funcionamiento de la nitrogenasa. El fósforo actuaría más bien a nivel del vegetal.

- **Gases:** es bien conocido el efecto del O_2 en la enzima. En general, la rizosfera de la mayoría de los cultivos presenta baja pO_2, alto nivel de CO_2 y suficiente N_2, que nunca es limitante, como para favorecer la fijación.

- **pH:** ciertas rizosferas presentan pH demasiado bajo para el desarrollo de diazotrofos neutrófilos, como el *Azotobacter*.

- **Pesticidas**, la aplicación de altas dosis de herbicidas y fungicidas puede afectar las densidades de estas bacterias. Alta inhibición de la actividad nitrogenasa se encontró en rizosferas de numerosos cultivos.

Inoculación

Desde la década de los sesenta, se citan en la bibliografía incrementos en los rendimientos de maíz y trigo de un 10 a un 20% al inocularlos con *Azotobacter* spp. El tema ha sido retomado en la década de los setenta, donde se citan aumentos de materia seca sobre el control de un 66% al inocular *Digitaria decumbens y Pannicum maximum* con *Azospirillum*. En mijo perla, la inoculación con 40 kg N/ha/año produjo materia seca equivalente a una fertilización con 80 kg N/ha/año, a los 70 días de crecimiento. Una ligera fertilización nitrogenada en la siembra favorece la fijación rizoférica.

En algunos ensayos se obtiene más respuesta en los testigos regados con el filtrado acelular de los diazotrofos, indicando que los efectos pueden explicarse por la producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal por estos organismos.

Se observan: cambios en la morfología radical de plantas inoculadas, aumento del número de raíces laterales profusamente cubiertas con pelos radicales.

Se han identificado giberelinas del tipo A_1, A_3 e iso-A_3 en cultivos de *A. ipoferum* (Bottini *et al*, 1989) y la inoculación en maíz incrementó el peso seco, la densidad de pelos radicales y la longitud total de la raíz, con efecto similar al agregado de 40 pg/mL de GA_3 y 2000 pg/mL de AIA.

Para verificar estos efectos se trabaja con mutantes de espirilos sin nitrogenasa funcional, pero capaces de elaborar sustancias del tipo de las fitohormonas, para incluirlas en las parcelas control.

Estos microorganismos son empleados como inoculantes en zonas agrícolas de distintas partes del mundo, en maíz, arroz, cultivos hortícolas, trigo, yute, algodón, caña de azúcar (Urquiaga, Döbereiner, 1991), solos o en combinación con fertilizantes (González-Lopez, 1992).

El cuadro 1 muestra el efecto de inoculación (I) de maíz con tres cepas de *Azospirillum* en suelo Haplustol, de Argentina. Además de un incremento en los rendimientos similar a la fertilización (N) con 60 kg N-urea/ha en los tratamientos inoculados, se apreció importante desarrollo de raíces y persistencia de altos niveles de inóculo (10^8 células.g^{-1} raíz en la cosecha) (Fulchieri y Frioni, 1994).

Cuadro 1 - Inoculación de maíz con *Azospirillum* en Río Cuarto, Argentina (datos en cosecha)

	N-urea	Inoculada	Testigo
Peso seco parte aérea (g/planta)	90,84a	79,16a	46,19b
Peso seco raíz (g/planta)	34,00	65,50	26,93
log_{10} Nº *Azospirillum*/g raíz	5,82b	8,03a	4,55b
Nº granos por espiga	333	359	109
Peso seco granos(kg/ha)	4122a	4447a	2792b

Dos o más tratamientos señalados con la misma letra no difieren por Tuckey 5%.

La evaluación de la FBN por *Azospirillum* en la rizosfera de numerosos cultivos de interés agronómico se ha incrementado en los últimos años, pero su **importancia agronómica es actualmente menor que lo que se preveía**. En resumen

- La producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal parece ser el principal mecanismo. La colonización bacteriana ocurre principalmente en la mayoría de las especies vegetales estudiadas en la zona de elongación de las raíces

- *Azospirillum* estimula la densidad y longitud de pelos capilares, la velocidad de aparición de raíces laterales y la superficie radical (Okon, 1994). La intensidad de estos efectos depende de la especie vegetal y del cultivar y de la concentración del inóculo de *Azospirillum.* En muchos ensayos el óptimo fue de alrededor de $1.l0^7$ unidades formadoras de colonias (ufc)/semilla^{-1} o plántula^{-1}

- La inoculación con *Azospirillum* afecta la concentración de ácido 3-indol acético y 3-indol butírico libres, así como las velocidades específicas de respiración y actividades de enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de la glicólisis en raíces de maíz y otras plantas. Esto contribuye a que las raíces tomen más agua y nutrientes minerales que favorecen un mayor crecimiento de las plantas inoculadas

- El efecto de la inoculación parece evidenciarse principalmente en los estados tempranos del desarrollo vegetal, durante las primeras semanas luego de una correcta colonización de las raíces

- La evaluación de datos acumulados en los últimos 20 años indica que la inoculación a campo *Azospirillum*, puede incrementar el crecimiento de importantes cultivos (Okon y Labandera, 1994).

Empleo de las cianobacterias como biofertilizantes

Desde la década de los sesenta se informan en Japón resultados de inoculación en suelos inundados de arroz (cuadro 2). La contribución a la economía del nitrógeno en suelos de la zona templada no sería tan importante, pues son muy afectadas por la desecación.

Nostoc, Anabaena, mantienen su efecto estimulante luego de la esterilización, y se piensa que su acción se debe a sustancias del tipo de las **citoquininas**, más que a auxinas y/o giberelinas, más termolábiles.

La práctica de la inoculación se va popularizando, los cultivos son fáciles de propagar en agua con sales minerales a la luz y su transporte se facilita si se mezclan con arena y se secan. Los productores comienzan a propagar sus inóculos en piletas vecinas a los cultivos de arroz. El cuadro 2 muestra en a) el efecto de la inclusión de *Azolla* en el crecimiento y contenido de N en plantas de arroz, con y sin período seco en el cual el helecho se seca y muere y en b) la inoculación con *Tolypothrix* en el agua de riego en el mismo cultivo.

En la mayoría de los suelos agrícolas de zonas templadas, el aporte en N por cianobacterias no es muy alto, en parte por los requerimientos de luz y humedad. Además muchas veces la superficie de los suelos se deseca por largos períodos de tiempo. Una irrigación oportuna favorece la práctica de inoculación. Son muy empleadas en cultivos inundables, como es el caso del arroz.

Cuadro 2 - Manejo del cultivo de arroz con *Azolla* (a) y *Tolyothrix* (b)

a)		**Arroz por maceta**	
tratamiento	**agua**	**peso seco (g)**	**N total(mg)**
testigo	continuo	37	221
	c/sequía	40	240
c/*Azolla*	continuo	43	316
	c/sequía	49	465

b)			
condición	**rendimiento**		**% de incremento**
suelo mal drenado	testigo	45	
	inoculado	60	33
suelo drenado	testigo	30	
	inoculado	38	26

Las células en simbiosis presentan también más bajo contenido de gránulos de **cianoficina** que representan reservas de nitrógeno con ácido aspártico y arginina en relación 1/1 molar. Los gránulos de **polifosfatos** son abundantes en simbiosis. Las **ficobiliproteínas** constituyen reservas de nitrógeno, además de actuar como pigmentos accesorios en el fotosistema II.

La luz es necesaria para la fijación. Los líquenes toleran condiciones extremas: en regiones de Suecia y Noruega, la fijación ocurre a OºC y los organismos sobreviven a heladas prolongadas y a la sequedad, aunque no fijan N_2 hasta que se rehumedecen. Constituyen la vegetación principal de ambientes extremos como piedras, zonas arenosas, facilitando luego la colonización por otros microorganismos. La cianobacteria posee escasa actividad de **glutamino sintetasa**, bloqueando parcialmente la ruta primaria de asimilación de NH_3, que es liberado y transferido al hongo.

Se citan niveles de fijación de nitrógeno de 25-50kgN/ha/año para cianobacterias en vida libre, 12 a 21kgN/ha/año para asociaciones con *Gunnera*, 300 en *Azolla* y 40-40kgN/ha/año, en líquenes.

Fijación de nitrógeno por simbiosis nodulares

Asociaciones rhizobio-leguminosa

Bacterias heterótrofas conocidas como rhizobios se asocian en estructuras nodulares fijadoras de N_2 en leguminosas (figura 2), contribuyendo de manera fundamental a la fertilidad del suelo, a la producción de alimentos para el hombre y animales y a la economía de fertilizantes nitrogenados, ya que muchas de las leguminosas son autosuficientes en sus requerimientos en nitrógeno.

La bibliografía sobre este tema es enorme y los estudios se amplían fuera de las leguminosas cultivadas: alfalfa, maní, soja, poroto, vicia, tréboles, etc., hacia leguminosas indígenas y hacia las arbóreas, cuyo empleo en forestación en suelos degradados ofrece una enorme perspectiva.

Luego del aislamiento del rhizobio por Beijerinck, en 1888, los trabajos sobre esta bacteria y sus asociaciones con leguminosas se han incrementado rápidamente. Boussingault puso en evidencia en 1838 la capacidad de las leguminosas en emplear el N_2 atmosférico, pero, solamente 50 años más tarde, Hellriegel y Wilfarth demostraron de manera indiscutible que sólo las leguminosas noduladas pueden hacerlo y que el lugar de fijación eran los nódulos. Luego de estas clásicas experiencias se pudo comprobar fehacientemente que el lugar de fijación son los nódulos y que los microorganismos se encuentran en el suelo o deben inocularse.



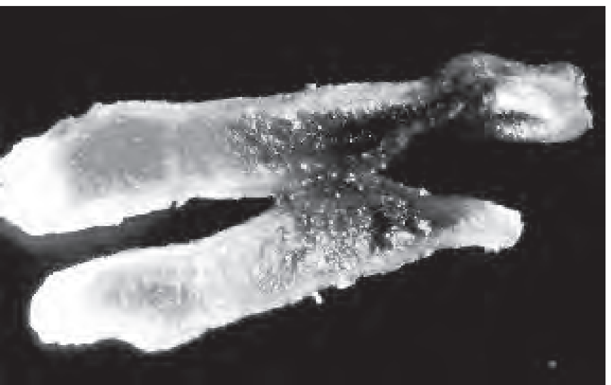


Figura 2- Leguminosa nodulada. Arriba: raíz con numerosos nódulos, Abajo: corte de nódulo con zona colonizada con bacteroides, coloreada de rojo por la leghemoglobina

Para **determinar la fijación de N_2** en un sistema simbiótico de manera rápida y sencilla:

- se compara el **tenor de nitrógeno** en leguminosas noduladas con el de las no noduladas cultivadas en ausencia de nitrógeno combinado

- el empleo de **N^{15}** confirma los resultados y con el uso de variedades no nodulantes de la leguminosa en estudio se puede conocer la fracción de nitrógeno del cultivo que proviene del aire, del suelo y de otras fuentes (Barea, 1991). En el campo, se incorpora un fertilizante marcado (ejemplo sulfato de amonio enriquecido con N^{15} y en lugar de isolíneas no fijadoras se puede emplear controles no fijadores (soja no inoculada en suelos sin rhizobio específico, o sorgo). El N fijado se calcula por la ecuación:

$$\text{N fijado} = 1 - \frac{\%\ \text{átomos } N^{15} \text{ en exceso en plantas fijadoras}}{\%\ \text{átomos } N^{15} \text{ en exceso en plantas no fijadoras}}$$

- la **reducción del acetileno** a etileno por la nitrogenasa, a pesar de las limitaciones señaladas en el capítulo 11, se emplea para comparar sistemas simbióticos

Las leguminosas

Las plantas de la familia de las Leguminosas o *Leguminoseae* (cuadro 3) son muy numerosas (entre 16.000 y 19.000 especies). También se la designa como *Fabaceae* o Fabales. De origen tropical arborescente cuyos más recientes derivados son pequeñas matas o hierbas de las regiones templadas. Representan la tercera familia de plantas de flor, superadas por las *Compositae y las Orchidacea*. Desde su origen en el Cretáceo superior, en condiciones tropicales húmedas, fueron extendiéndose a otras condiciones climáticas.

Grupo muy diversificado en el plano taxonómico con 3 sub-familias: *Caesalpinoideae, Mimosoideae y Papilionoideae*. No todas las especies están noduladas: cerca del 20% de las *Papilionoideae* (unas 3.400 especies) se han analizado por su aptitud para nodular.

Cuadro 3- Las leguminosas

700 géneros, 16 a 19.000 spp distribución cosmopolita
Origen: trópico (120 millones de años)
Árboles, arbustos o hierbas ***3 subfamilias***
Mimosoideae: leñosas, zonas áridas, frías (menor tamaño)
Madera (*Prosopis*), taninos (*Acacia*), ornamentales: *Calliandra*, espinillo, mimosas, timbó, forraje: *Leucaena*
Caesalpiniodeae: leñosas Usos: taninos/tinturas *(Caesalpinia*); ornamentales (*Cassia, Peltophorum dubium (ibirapitá), Bauhinia*
Papilionoideae (Faboidea) 12.000spp economía humana, de grano, forrajes, madera, medicina, industria, textiles

El cuadro 4 muestra la característica de nodulación en las subfamilias. Se observa que el 48% de los géneros han sido examinados por la nodulación, y el 86% se encontraron nodulados.

En las *Mimosoideae y Papilionoideae*, el 90 y 97%, respectivamente, poseen especies noduladas, mientras que en *Caesalpinioideae* sólo el 23% de los géneros examinados evidenciaron habilidad para nodular.

Los siguientes son los géneros que poseen el mayor número de especies noduladas: en *Mimosoideae, Acacia* (217); en *Papilionoideae, Indigofera* (194), *Crotalaria* (145),*Trifolium* (141), *Astragalus* (102), *Tephrosia (*95*), Desmodium (76), Vicia* (65*) y Aspalathus (60); en Caesalpinioideae, Cassia* (99).

Una de las principales características que evidencian el carácter evolutivo de la leguminosas se relaciona con las modificaciones en su forma y tamaño: desde árboles tropicales muy altos, pasando por arbustos , a trepadoras leñosas, hier-

Cuadro 4 - Nodulación en las leguminosas

Subfamilia	**Nº géneros**	**Nº géneros analizados**				**Nº especies**	**Nº especies analizadas**			
		+	**+/-**	**-**	**total**		**+**	**+/-**	**-**	**total**
Mimosoideae	66	18	8	5	31	2900	351		37	388
Caesalpinoideae	177	13	13	39	65	2800	72	6	180	258
Papilionoideae	505	241	14	14	169	14000	2316		46	2462
Total	748	272	35	58	365	19700	2839	6	263	3108

bas perennes o hierbas anuales. Las especies adaptadas a zonas templadas están aclimatadas a desarrollarse en suelos de alta fertilidad con elevados tenores en calcio y poseen baja eficiencia en la extracción del mismo y probablemente de otros nutrientes cuando crecen en suelos de baja fertilidad. Presentan problemas de desarrollo y nodulación en suelos ácidos, a diferencia de las especies tropicales que presentan alta capacidad de extracción de nutrientes en suelos ácidos, aunque algunas como *Desmodium e Indigofera* responden positivamente al encalado.

En el país las leguminosas presentan gran potencial de uso, como alimento, en especies de grano, forrajeras y árboles en los montes nativos y en asociaciones silvopastoriles. Recientemente se han descrito las especies nativas de Uruguay y zonas vecinas (Izaguirre y Beyhaut, 1998, 2003) (cuadro 5).

Cuadro 5- Leguminosas en Uruguay

2.300 spp en la flora total	**10% son leguminosas**
73 géneros	272 spp
9 *Mimosoideae*	48 spp
8 *Caesalpiniodeae*	23 spp
56 *Papilionoideae*	201 spp (130 nativas, 71 adventicias y/o cultivadas)
Géneros con mayor número de especies	
Adesmia Vicia Desmodium Lathyrus Galactia	

Especificidad en la infectividad y en la efectividad

Algunas cepas de *Rhizobium o Frankia* poseen un amplio espectro de huéspedes. Otras cepas poseen un pequeño espectro y se les dice específicas. Este tema de la especificidad debe verse desde el punto de vista del micro y del macrosimbionte. Basados en sus características de especificidad para la nodulación y la fijación, se reconocen tres tipos de leguminosas:

- El primer grupo está integrado por especies noduladas por amplio rango de cepas genéticamente diversas y fijan N_2 efectivamente en asociación con estas cepas. Estas especies son: **promiscuas en la nodulación y en la efectividad,** por ej. *Vigna unguiculata, Macroptilium atropurpureum (siratro), Acacia crassicarpa* (CL), *A. auriculiformis (CL), Albizia lebbek (CL), Paraserianthes falcataria* (CL).

- El segundo grupo esta formado por especies noduladas por un amplio rango de cepas genéticamente diversas pero sólo fijan N_2 con un limitado grupo de cepas específicas: **promiscuas para la nodulación y específicas para la efectividad**, ej. *Acacia mangium (CL), Robinia pseudoacacia (CR), Acacia mearnsii (CL).*

- El tercer grupo está integrado por especies que son específicas en sus requerimientos, por lo que nodulan efectivamente con un pequeño rango de cepas: **son específicas para la nodulación y también para la efectividad**. Ejemplos: *Leucaena leucocephala (CR), Gliricidia sepium (CR), Calliandra calothyrsus* (CR)

Una limitación de esta clasificación es que el carácter de promiscuo o específico depende del rango de cepas testadas por lo que deben realizarse gran número de ensayos de inoculación.

Nodulación

La fijación biológica del N_2 en los nódulos de leguminosas es el resultado de complejas interacciones entre el huésped y el endofito la instalación de la simbiosis está controlada por un dialogo molecular entre ambos integrantes (Kondorosi, 1991). La eficiencia es máxima en estos sistemas ya que existe:

1. **protección de variables ambientales** y la FBN puede funcionar bajo amplio rango de condiciones. Así, nódulos de soja, son relativamente insensibles a la temperatura sobre un rango de 15ºC, y pueden fijar N_2 a concentraciones externas de O_2 entre 0,05 y 0,8 atm, mientras que los bacteroides fijan N_2 en rango más estrecho (10^{-6}, 10^{-4} atm). La protección frente al O_2 es una de las principales ventajas de los sistemas simbióticos

2. aporte de esqueletos carbonados por los vasos de la planta que le asegura la generación de energía y poder reductor para el endosimbionte y la actividad nitrogenasa

3. transferencia del N fijado a la planta, disminuyendo el nivel de N combinado en la vecindad de nitrogenasa, principal causa de inhibición del proceso. Las leguminosas se clasifican según la forma de exportar el N combinado:

- **productoras de amida**s (asparagina, glutamina), sobretodo las leguminosas de zona templada
- **productoras de ureídos** (alantoína, ácido alantoíco), sobretodo en las leguminosas de zona tropical.

La figura 3 (Dommergues *et al.,* 1999) presenta un esquema que resume el diálogo molecular entre *Sinorhizobium* y alfalfa que se traduce en intercambio de señales que permiten distinguir tres niveles de especificidad indicadas en el esquema por asteriscos.

El proceso comienza con la exudación de sustancias inductores (flavonoides, betaínas) por la raíz. En su presencia, las proteínas reguladoras sintetizadas por los genes nodD de la bacteria son activadas e inducen los genes estructurales de la nodulación. Estos incluyen los genes comunes A, B y C, encontrados en todas las especies de *Rhizobium* y genes específicos a una especie de *Rhizobium.*

La expresión de genes estructurales conduce a la producción de señales bacterianas constituidas por lipo-oligosacáridos de glucosamina sulfatado, de PM 1.102, inducido por flavonoides; éstos son los factores de nodulación o factores Nod, que estimulan la curvatura de pelo y la división de las células corticales**.**

Los sustituyentes químicos en la molécula base son los responsables en gran parte, de la especificidad hacia el hospedante.

En el curso de esta simbiosis, el programa genético de la planta hospedera es considerablemente modificado y muchos genes de la planta se expresan en los nódulos.

El cordón de infección se produce luego de invaginación de la pared del pelo y crece a lo largo del mismo. Las bacterias diferenciadas en **bacteroides** se rodean de una **membrana peribacterial** que deriva de la membrana de la célula vegetal.

En la **nodulación** se distinguen varias etapas resumidas en el cuadro 6 (Sprent y Sprent, 1990) y en la figura 4 (a, b y c, Wood y Newcomb, 1989; d, Truchet *et al.*, 1989.

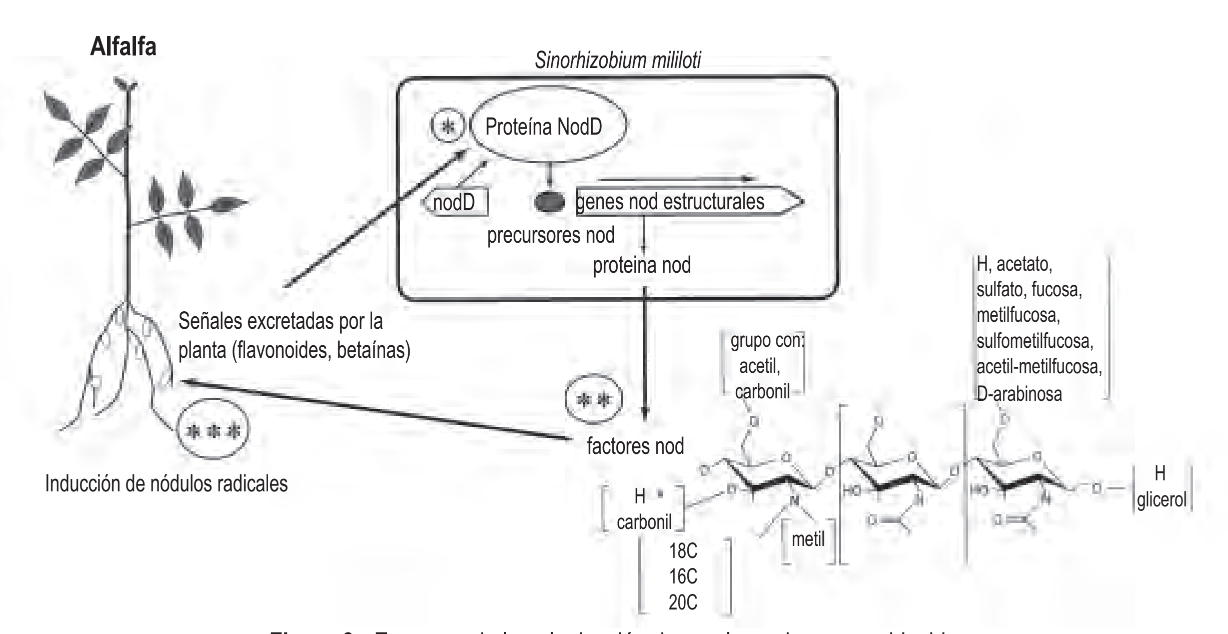


Figura 3- Esquema de la colonización de una leguminosa por rhizobio

Cuadro 6 - Interacción entre rhizobio y leguminosa en la formación de nódulos

Fases	**Requerimientos**	**Observaciones**
Multiplicación en suelo y raíz	Secreciones radicales pueden estimular o inhibir	Especificidad variable
Encurvamiento pelos radicales	Compatibilidad entre planta y rhizobio	Especificidad variable
Entrada de la bacteria	Invaginación y/o disolución o debilitamineto de la pared celular de la planta (enzimas)	La planta puede tener factor genético no-nodulante. Muy afectada ambiente (temp, pH)
Cordón de infección	Sincronismo entre crecimiento de la bacteria y pared celular de la planta	En nódulos perennes, los cordones son también perennes
Formación de nódulos	Balance entre factores de crecimiento del rhizobio y la planta	Rh-bacteria específico inhibido alta temperatura y nitratos
Formación células infectadas	Liberación rh del cordón, sincronismo en el crecimiento de la membrana de la célula vegetal y la multiplicación del rhizobio	Inhibida por factores ambientales y un nutricionales que afectan crecimiento vegetal
Formación bacteroides, síntesis N_2asa y leghemo globina	Intercambio de señales y complementación genética	Combinación planta y rhizobios específicos
Mantención del tejido nodular con bacteroides	Intercambio de metabolitos (HdeC, N-org)	Afectada por altas temperatura, alto nitratos, baja H%

La falla en alguna de estas delicadas etapas conduce a simbiosis deficientes o abortivas.

- **Multiplicación rizosférica de los rhizobios**, a partir de materiales excretados por las raíces. Este proceso no es específico y se citan estimulaciones de rhizobios por rizosferas de gramíneas y otras plantas

- **Adhesión** entre la bacteria y células superficiales de los pelos radicales. La marcada especificidad en esta simbiosis se ha explicado en parte, por la teoría de las **lectinas,** glucoproteínas específicas que se unen por un lado a hidratos de carbono producidos por el hospedante, y por el otro a receptores moleculares de la bacteria. Leguminosas de diferentes grupos de inoculación cruzada sintetizan lectinas con diferente afinidad por azúcares. Estas sustancias se encuentran en semillas, raíces, hojas o tallos y se piensa que cumplen varias funciones

Algunos autores comparan a estas moléculas con los anticuerpos: los sitios a unir, en la bacteria y la planta, poseen afinidad por la misma molécula, llamada **trifolina**, en tréboles.

Funciones de las lectinas en la FBN:

I. adsorción no específica entre rhizobio y raíces

II. rol específico en la nodulación: se unen a receptores bacterianos través de los exopolisacáridos (EPS) o derivados de EPS. Mutantes EPS^- no nodulan a su hospedante.

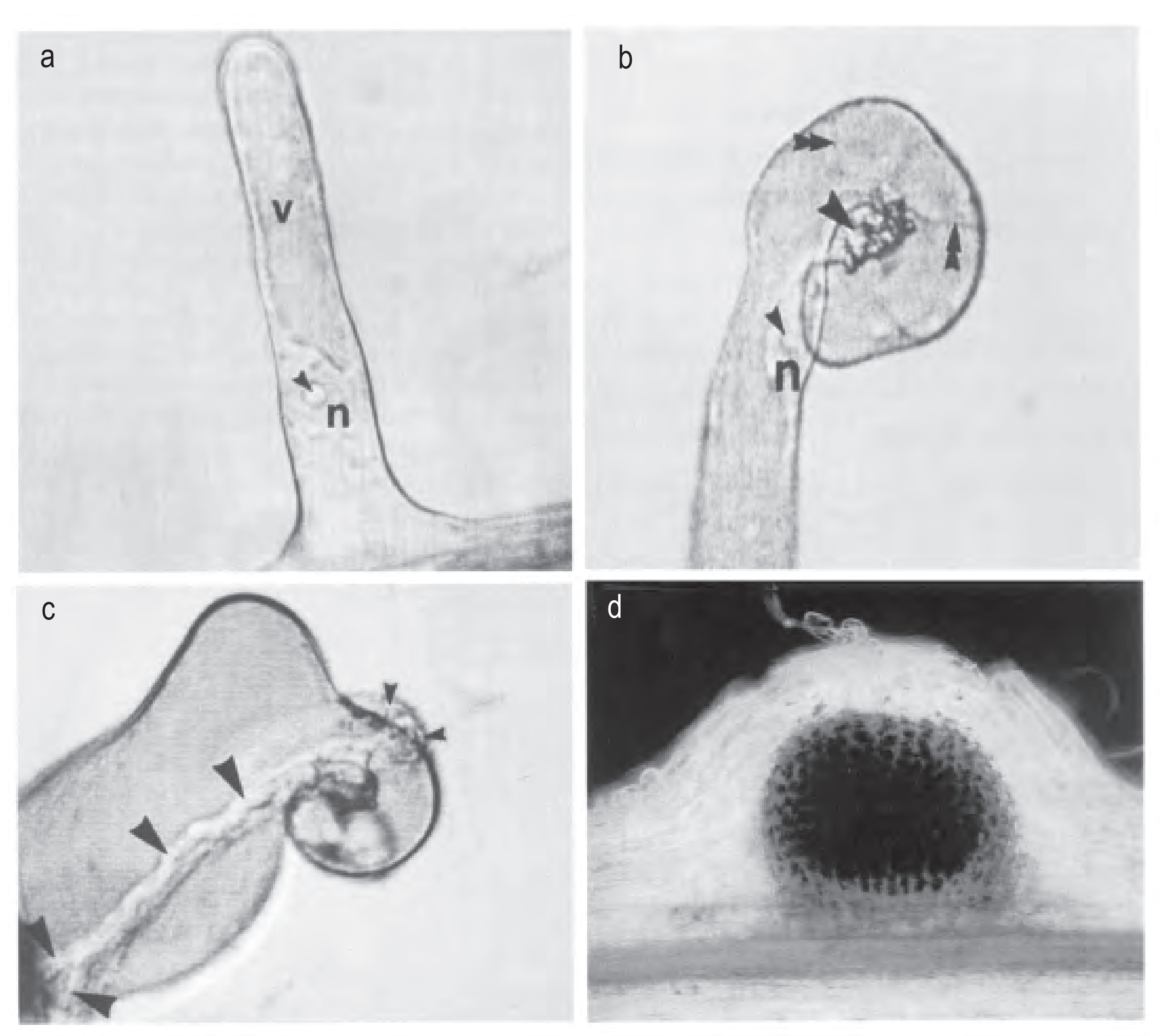


Figura 4 – Etapas tempranas en la nodulación en alfalfa: a) pelo absorbente no inoculado, n=núcleo, v=vacuola), b) encurvamiento del pelo, 8 horas luego de la inoculación, la flecha grande muestra masa de bacterias en el bucle, c) raíz luego de 11 horas de la inoculación, con cordón de infección, d) raíz colonizada luego de 5 días de la inoculación con un nódulo en formación.

- **Encurvamiento de los pelos y marcada deformación de los mismos,** constituyen los primeros pasos de la infección. El pelo se encurva y encierra al rhizobio adherido. El fenotipo se designa como **Hac**$^{+}$. Rhizobios heterólogos son incapaces de inducir encurvamiento de los pelos. La producción de sustancias con caracter de **fitohormonas** como el AIA, debilitaría las paredes de los pelos, facilitando la deformación que precede a la infección. Las giberelinas inhibirían el desarrollo de futuros nódulos.

- **Penetración de la bacteria a través de la pared de los pelos radicales y formación de un cordón de infección tubular,** intracelular que confina a las bacterias a medida que ellas penetran en las células del hospedante. En trébol blanco, se observó cordón de

infección 2 días luego de la inoculación con rhizobio infectivo. Exámenes en cultivos en hidroponia sugirieron que se requiere estrecha proximidad del núcleo de las células de los pelos radicales y el ápice del cordón, mientras éste avanza hacia la base del pelo. Allí, se ramifica en la pared celular y penetra en la corteza.

Dos hipótesis explican la invasión:
invaginación de la pared vegetal ante la presión de las bacterias y **participación de enzimas**, las bacterias dentro del pelo capilar pueden degradar la pared por enzimas líticas: carboxicelulasa y poliugalatouronasa.

- **Diferenciación nodular,** cuando el cordón llega a una célula particular (poliploide en relación al hospedante) cesa la síntesis de pared o ésta es degradada por enzimas líticas y la bacteria es liberada en células que formarán la zona infectada del futuro nódulo. En respuesta a esta invasión, ciertas células corticales son estimuladas a proliferar, se alargan y emergen como tejido nodular diferenciado, infectado con los rhizobios, que se transforman en **bacteroides.**

La membrana de la célula vegetal forma otro envoltorio para saparar los rhizobios de la planta: es la **membrana peribacterial**. Otro mecanismo de infección es por **heridas,** que se presenta en algunas simbiosis, como en rhizobio-mani y en el caso de *Frankia*-no leguminosas.

- **Fijación de N_2**, varios días después la bacteria dentro de las células hospedantes en nódulos efectivos comienzan a fijar nitrógeno y excretan amonio en el citosol de las células de la planta donde puede ser asimilado por acción de la **glutamato deshidrogenasa (GDH) y por acción de la glutamino sintetasa (GS) o de la glutamino-2-oxiglutarato-amino-transferasa (GOGAT).** Esta segunda ruta es empleada más frecuentemente.

El costo exacto en la simbiosis con leguminosas en términos de ATP empleado es motivo de polémica. Desde que la transferencia de cada electrón de los 8 involucrados en la reacción requiere la hidrólisis de 2 ATP, significa que un mínimo de 16 ATP se requieren por molécula de N_2 reducida.

En la práctica el costo es más alto, debido a la ineficiencia de la actividad de la N_2asa y a costos asociados al desarrollo y mantenimiento del nódulo a la asimilación y el transporte del amonio.

Las estimaciones en la literatura varían ampliamente, un dato generalmente reconocido se sitúa en **28 mol ATP por mol de N_2,** excluyendo los costos adicionales y hasta el 33% de la energía fijada fotosintéticamente.

Interacciones entre genes de la bacteria y de la planta
La iniciación y formación de los nódulos son el resultado de interacciones simultáneas de los genes de la planta y de las bacterias.

- **genes de la nodulación, genotipo específicos**, juegan un importante rol. Por ejemplo el genotipo arveja, *Pisium sativum* bv Afghanistan es nodulada por cepas de *Rhizobium* TOM pero no lo es por cepas europeas de rhizobio. Los genes que permiten a las cepas TOM a nodular arveja Afghanistan se han localizado en el plásmido simbiótico.

- **inducción de genes de la nodulación** por flavonoides e isoflavonoides, señales de la planta que inducen los genes **nod** han sido mostradas como necesarias para la inducción de los genes de la nodulación. Un hecho interesante es que los rhizobios de amplio rango de huéspedes, responden a un amplia gama de compuestos y aquellos con estrecho rango aceptan solamente un limitado número de flavonoides. Pico moles (pmol = 10^{-12} moles) de estos compuestos pueden inducir la expresión de los genes **nod** de rhizobio.

Genes de la nodulación

Las secuencias de ADN bacteriano que se requieren para la formación de nódulos fijadores de N_2 en raíces o tallos se refieren como genes **nod**. Más de 30 genes **nod** han sido identificados y secuenciados, más que las letras del alfabeto (nod A, nod Z) los futuros *loci* de nodulación son referidos como genes **nol** (nodulación loci).

En la mayoría de los miembros de los géneros:

- *Rhizobium*, los genes **nod** están localizados en **plásmidos** (también llamados plásmidos simbióticos o **sym**)
- *Bradyrhizobium y Azorhizobium,* los genes **nod** se localizan en el **cromosoma**

Tres tipos de *loci* de nodulación han sido identificados en varios rhizobios:

- **genes nod comunes**
- **genes nod específicos para el huésped (hsn)**
- **genes nod genotipo específicos (GSN)**

Los genes **nod** comunes son funcionalmente similares entre especies de rhizobios. Incluyen nod ABC y son necesarios para la iniciación y formación del nódulo (cuadro 7).

Los genes nod D están estrechamente ligados a los genes **nod** comunes. Poseen una función regulatoria, sus productos interactúan con señales moleculares vegetales (flavonoides e isoflavonoides) y activan la transcripción de otros genes **nod** inducibles. Los genes **nod ABC** codifican proteínas que determinan factores extracelulares que causan deformación de los pelos y división de células corticales de la raíz.

hsn (*host specific nodulation)* son los *loci* requeridos para nodulación de una planta específica en diferentes géneros de leguminosas. Cuando un locus de nodulación de un organismo donador es transferido a una cepa recipiente apropiada, la inhabilita a nodular la planta huésped del donador, el gen es considerado **hsn**.

GSN (*genotype-specific nodulation*) se refieren a genes que permiten la nodulación de genotipos específicos de plantas dentro de una especie de leguminosa dada.

A pesar de que muchos de los mismos genes de nodulación han sido encontrados en especies de *Rhizobium y Bradyrhizobium japonicum,* 3 diferencias separan a esas bacterias:

- *En B. japonicum* los genes de nodulación no se localizan en plásmidos sino que se distribuyen en el cromosoma.
- Los genes estructurales **nif DK y H** están físicamente separados por una distancia relativamente grande de los genes **nod**
- En el caso de rhizobios de crecimiento rápido las sustancias que inducen los genes **nod** (moléculas señal derivadas de las plantas) pertenecen a la clase conocida como **flavonoles, flavonas y flavanonas**. En *B. japonicum* las principales sustancias inductoras son **isoflavonas**.

Genes de la fijación del nitrógeno (cuadro 7)

Dos grupos principales de genes han sido descriptos:

- **Los genes nif** refieren a la secuencia genética que están específicamente involucrados en el proceso de FBN y que se correlacionan estructural y funcionalmente con diazotrofos de vida libre, sobretodo *Klebsiella pneumoniae.*
- **Los genes fix** (para la fijación) están también específicamente involucrados en la FBN, pero no se correlacionan con los de *K.pneumoniae.* Esta fue la primera bacteria fijadora de N_2 estudiada en detalle, por la adaptación de técnicas empleadas primeramente en *E.coli*.

Los productos de los genes **nif A y nif L** controlan el operón de todos los otros genes **nif**.

Genes fix junto a otros genes involucrados en la FBN son referidos colectivamente como **genes sym**, que incluyen a los necesarios para las interacciones iniciales con la planta (reconocimiento, encurvamiento, formación cordón de infección) y la formación y mantenimiento de los nódulos radicales o de tallos (**nod, nol, GSN y hsn)**. Además otro conjunto de genes bacterianos están involucrados en la biosíntesis de la parte hemo de la nodulina leghemoglobina, necesaria para la protección del O_2.

Cuadro 7 - Genes simbióticos en *Rhizobium y Bradyrhizobium*

Gen	Concepto	Función
hac	encurvamiento	Encurvamiento de pelos capilares
nod	nodulación	Eventos en desarrollo de nódulos
hsn	específicos del, hospedante	Determinación de especificidad del húesped
efn	eficiencia de la nodulación	Genes adicionales para eficiencia de la nodulación
ndv	desarrollo nódulo	Regulación del desarrollo del nódulo, ej: glucanos cíclicos
exop	polisacáridos extracelulares	Regulación de infección y liberación de bacteroides
nif	fijación de N_2	Involucrados en FBN homóogos a los de *Klebsiella*
fix	fijación	Genes adicionales involucrados en la FBN en estado simbiótico (sin homología con los genes nif de *Klebsiella)*
dct	transporte ác. di carboxílicos	Transporte de ác. di COOH- como sustratos para la FBN en bacteroides

Genética del hospedante

Las leguminosas muestran gran variabilidad genética en respuesta a la invasión por rhizobios. Varios autores, consideran que el hospedante es el que corrientemente desempeña el rol principal en el control de la simbiosis, afectando el tamaño, la forma y el número de nódulos, así como la efectividad de los mismos. Se reconocen:

- **genes de «no nodulación»** : ausencia de nódulos en plantas inoculadas con especie compatible de rhizobio, en distintas leguminosas: *r r en Trifolium pratense*, la bacteria no penetra en los pelos radicales; *rj1 rj1 en Glycine max*: la nodulación es controlada en las raíces, *Sym-l en Pisum sativum*, el hospedante no nodula a temperaturas menores a 26ºC y *Sym-2*, la inoculación con ciertas cepas de *R. leguminosarum* en el mismo hospedante produce fallas en la nodulación por aborto de los canales de infección.

- **morfología de los nódulos es controlada por el hospedante.** Se ha demostrado también que el genotipo del hospedante influye sobre la distribución de los nódulos en el sistema radical, así como en el número de nódulos formados.

- **nodulación efectivas o inefectivas:** el término «inefectiva» se aplica cuando la secuencia se interrumpe en algún momento. Varios genes del hospedante controlan la nodulación inefectiva.

- **eficiencia de la FBN**. Así, en soja variedad «Peking» inoculada con cepas de *R. japonicum* (serogrupo 123) se forman nódulos grandes de aspecto normal, aunque las plantas permanecen pequeñas y cloróticas, síntomas de deficiencia en N. Sin embargo, la misma variedad establece simbiosis eficientes con otras cepas de *R. japonicum* y lo mismo ocurre con las cepas del serogrupo-123 con otras variedades de soja.

- **nodulinas,** proteínas específicas sintetizadas como respuesta a la invasión por rhizobios, como por ejemplo la (**leghemoglobina**) con secuencias de mARN cuyo origen está en el hospedante.

Estructura nodular

Se cree que la formación de los nódulos está controlada por **fitohormonas: citoquininas, auxinas, giberelinas**, producidas no sólo por los rhizobios, sino también por el huésped frente al estímulo de la bacteria. Estas sustancias inducen repetidas divisiones celulares de células poliploides. El ácido absísico exógeno ejerce una inhibición específica y detiene la iniciación nodular.

En el futuro desarrollo del nódulo ocurren drásticos cambios anatómicos y citológicos en células de la corteza. Pequeñas células meristemáticas se convierten en grandes células con bacteroides. Su rápida senescencia una vez cumplida la función de fijación del N_2 está también relacionada con cambios en el balance hormonal. Los nódulos de leguminosas y los tumores de agallas de corona están inducidos por bacterias estrechamente relacionadas: *Rhizobium o Bradhyrhizobium y Agrobacterium,* y en ambos casos se reconoce la inducción hormonal: en nódulos posiblemente por auxinas y citoquininas, liberadas por los rhizobios, en las agallas, por hormonas que producen heridas.

Dos tipos de estructura primaria se pueden describir (figura 5) (Duhoux y Nicole, 2004).

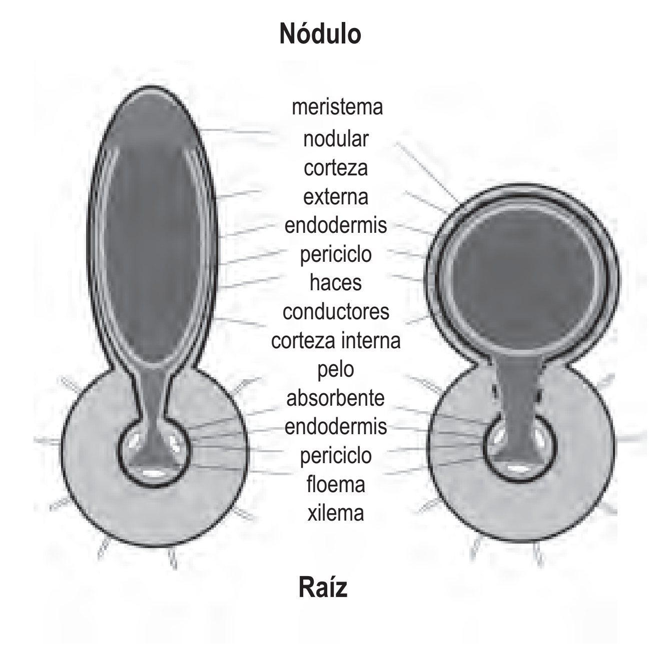


Figura 5 - Organización de nódulos indeterminados y determinados de leguminosa

- **determinados:** todas las partes se diferencian a la vez y la senescencia ocurre simultáneamente, por lo que estos nódulos tienen una existencia limitada. Ejemplos**:** aeschynomenoide (*Aeschynomene, Arachis*), desmodoide (*Arachis, Vigna unguiculata*). Todos los tipos, excepto caesalpinoides, se presentan en las *Papilionoideae*. El descubrimiento de nódulos en tallos de *Sesbania rostrata* permitió la inclusión de un tercer tipo de nódulos determinados: sesbanoide

- **indeterminados:** con meristema apical que continúa activo a través de la vida del nódulo, dando nuevos lóbulos activos. Ejemplos: caesalpinoides (*Mimosa, Albizia*), crotalarioide (*Vicia faba*), lupinoide (*Lupinus)***.** Los nódulos perennes son del tipo indeterminado, el meristema persistente es capaz de reiniciar la actividad en cada estación de crecimiento.

En el nódulo maduro se diferencian las zonas:

a. cortical, formada por células no diferenciadas ni infectadas. En especies perennes estas células pueden aparecer suberificadas

b. zona meristemática, con activas divisiones celulares, con células no infectadas que darán origen a las otras zonas. En los nódulos efectivos la actividad meristemática es más prolongada

c. zona vascular, constituye un sistema de vasos ligados a los de la raíz y por ellos la planta aporta los materiales energéticos y retira los productos nitrogenados resultantes de la fijación

d. zona bacteriana, o de infección, con células colonizadas y otras no. Las primeras contienen a los bacteroides y aparecen hipertrofiadas, alcanzando dimensiones 4 a 8 veces superiores a las células sin bacterias. El volumen de tejido infectado nos da un índice de la capacidad de fijación. Los **bacteroides** aparecen al microscopio electrónico individualmente o en grupo dentro de envolturas membranosas de origen vegetal.

En las células colonizadas aparece una hemoproteína, la **leghemoglobina**, que se une específicamente al O_2 y lo libera a bajas concentraciones de O_2. La concentración de esta sustancia sólo encontrada en los nódulos de leguminosas y no-leguminosas, se incrementa a medida que la fijación progresa y su determinación colori-

métrica se emplea como medida de la potencialidad de fijación.

Su principal función está relacionada con la provisión de adecuadas cantidades de O_2 para el metabolismo respiratorio de los bacteroides, manteniendo el nivel suficientemente bajo, como para no dañar el funcionamiento de la nitrogenasa.

La constante de equilibrio para la oxigenación de la leghemoglobina (0,04. 10^{-6}M) asegura que los bacteroides suspendidos en solución parcialmente oxigenada de este pigmento, se encuentren en concentración de O_2 libre en el rango para una óptima producción de ATP y para la fijación del N_2. En los nódulos, la concentración de leghemoglobina es del orden de 1 mM, o sea 10^5 veces superior a la concentración para su máxima actividad. El efecto tampón es muy grande, minimizando el efecto de concentraciones fluctuantes de O_2.

La cantidad de nitrógeno fijado en los nódulos es función de:

- **el volumen del tejido con bacteroide**
- **su actividad específica,** es decir, la eficiencia en la fijación del N_2
- **el tiempo en que permanece activo**

Las relaciones entre la bacteria, el huésped y su ambiente pueden afectar a la fijación del N_2. Usualmente, la restricción en el número de nódulos es compensada por un mayor tamaño de los mismos. Para evaluar tempranamente la fijación se tiene más en cuenta la masa de tejido nodular, que su número.

El cuadro 8 presenta algunas de las características de los nódulos efectivos y de los inefectivos (que no fijan cantidades detectables de N_2). Entre ambos grupos existen varios grados de efectividad.

Nódulos aéreos

La interacción rhizobio-leguminosa se da también en ciertas plantas a nivel de los tallos (nodulación aérea o caulinar). Es bien conocida en varias especies de *Sesbania* como S. *rostrata*, leguminosa arbustiva que habita regiones anegadas, en *Aeschynomene*, *Neptunia natans, Discolobium pulchellum, Eritrina crista-galli* y en plantas actinorróticas (*Casuarina equisetifolia, C. glauca y C. cunninghamiana).* El género *Aeschynomene* posee unas 350 especies de origen tropical, muchos de ellos viven en ambientes semi áridos y en suelos inundados en estación de lluvias. Se han descrito 22 especies con nódulos aéreos (Duhoux y Nicole, 2004).

Cuadro 8 - Diferencias entre nodulación efectiva e inefectiva

Nódulos efectivos	**Nódulos inefectivos**
pocos y situados sobretodo en la raíz primaria	numerosos y repartidos en todo el sistema radical
voluminosos de superficie lisa o rugosa	pequeños, de superficie lisa
actividad meristemática y nodular prolongada	actividad meristemática y nodular corta
infección generalizada, zona bacteriana grande, con bacteroides	pocas células infectadas, pocos o sin bacteroides presencia de gránulos de almidón
interior rojo por la leghemoglobina	no pigmentados de rojo

Las bacterias simbióticas que nodulan tallos de *Aeschynomene* son *Bradyrhizobium*, fijadoras al estado libre *in-vitro,* como *Azorhizobium*, algunos son además fotosintéticos con pigmentos como la bacterioclorofila, carotenoids y fotocromos. En la isla de La Reunión y en México, casuarinas localizadas en lugares de mucha lluvia, presentan en sus troncos protuberancias con nódulos (figura 6) (Duhoux y Nicole, 2004).

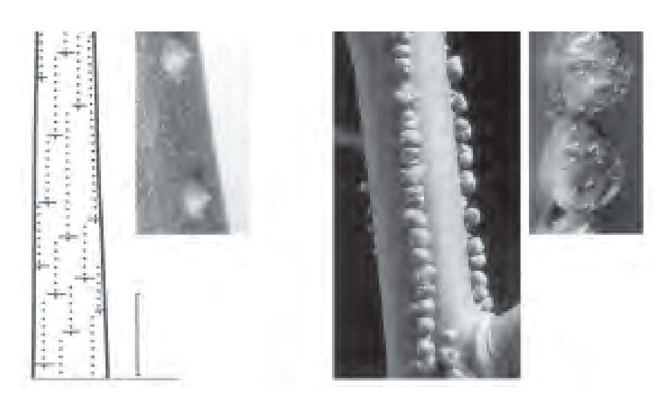


Figura 6- Nódulos caulinares en *Sesbania rostrata*. Desarrollo del tallo, cada punto representa un sitio de nodulación, los sitios de nodulación son puntos de salida de raíces adventicias, nódulos áereos y corte de un nódulo.

Otras enzimas que poseen los rhizobios

Hidrogenasa: La nitrogenasa libera H_2, que puede perderse o ser recapturado por una hidrogenasa: la reacción simplificada es

$H_2 + X \longrightarrow H_2X$ X es el aceptor final de electrones, usualmente el O_2

El gran interés de la hidrogenasa se ha centrado en su posible rol en incrementar la eficiencia de la FBN. El término Eficiencia relativa **(ER)** ha sido definido como:

$$ER = \frac{\text{electrones usados en la reducción del } N_2}{\text{flujo total de electrones a la nitrogenasa}}$$

Experimentalmente se determina:

$$ER = 1 - \frac{H_2 \text{ liberado en aire}}{H_2 \text{ liberado en atm.sin } N_2}$$

$$ER = 1 - \frac{H_2 \text{ liberado en aire}}{C_2H_2 \text{ reducción}}$$

Dado que hasta un 25% de los electrones destinados a la N_2asa se pueden perder en la evolución del H_2, el máximo valor para la ER será 0,75. En realidad se encontraron valores entre 0,40 a 0,99. Valores superiores a 0,75 son sólo posibles si algo del H_2 liberado por la N_2asa no se detecta en la evolución neta del H_2. Se postula que la presencia de una hidrogenasa puede contribuir a incrementar la eficiencia de la FBN en varias vías:

- provee una fuente de **poder reductor** que puede resultar metabólicamente útil, por ejemplo en la regeneración de ATP.
- la oxidación del H_2 está acoplada a la **consumición del O_2**, por lo tanto se protege a la N_2asa.
- el **H_2 es un inhibidor** de la reducción del N_2 por la N_2asa y la actividad H_2asa puede remover un potencial inhibidor de la reducción del N_2.

Existe mucho debate sobre el hecho de que la presencia de una activa H_2asa (fenotipo Hup^+) confiere un beneficio significativo a las leguminosas en el campo. Comparación entre simbiosis con Hup^- y Hup^+ han dado resultados variables. La planta puede afectar la expresión de la actividad de la hidrogenasa, unas 128 cepas de *B.japonicum* expresan actividad H_2asa en simbiosis con *cowpea*, pero no con soja.

Protección de la nitrogenasa frente al oxígeno

En los sistemas simbióticos diferentes mecanismos de protección están involucrados:

- **la corteza** de los nódulos constituye una importante **barrera física** a la difusión del O_2
- **la leghemoglobina** en leguminosas o **hemoglobina** en plantas actinorríticas. Este pigmento rojo se presenta en el tejido central de nódulos fijadores, rodeando a los bacteroides. Esta molécula es una **nodulina**, hemoproteína temprana sintetizada en los nódulos. La fracción proteica parece ser codificada por el vegetal, mientras que los bacteroides serían los responsables de la síntesis de la fracción hemo
- **la respiración de los bacteroides** contribuye a la remoción del O_2 (6 veces más alta que en nódulos inefectivos)

- **la hidrogenasa** contribuye a la protección de la nitrogenasa al eliminar el H_2

Autoregulación en la formación de nódulos

Con mucho N combinado en el suelo, la planta regula la nodulación. La planta puede también controlar la formación de nódulos en ausencia de nitrógeno combinado: se habla de **autoregulación**. La zona susceptible de las raíces no puede soportar futuras nodulaciones luego del establecimiento de la primera infección. Existe evidencia de que la emergencia de nódulos en leguminosas está controlada por mecanismo de señal y respuesta. Las siguientes hipótesis pueden explicar la autoregulación:

- los rhizobios inducen divisiones celulares en la corteza
- estas divisiones producen una señal transtocable que actúa directamente o por la parte aérea para suprimir la activiadad de división celular en la corteza.

Los problemas de la **competencia** de la cepa del inoculante con rhizobios nativos es motivo de estudios a nivel genético y caracteres que favorecen la colonización como: movilidad, producción de antibióticos, características de superficie para la adhesión, velocidad de nodulación, se están identificando e introduciendo en cepas altamente fijadoras. El empleo de un par rhizobio-leguminosa con infectividad suficientemente restringida para prevenir la nodulación por la población indígena será una muy buena solución, independizando al inoculante del nivel de rhizobios del suelo.

Factores limitantes de la FBN en la simbiosis rhizobio-leguminosa

Los factores que afectan la sobrevivencia de la bacteria en el suelo y aquellos que afectan la iniciación de los nódulos, son sin duda decisivos en el éxito de la simbiosis. Por ser un proceso resultante de complejas reacciones fisiológicas y bioquímicas, que involucra especies distintas, la FBN depende de la expresión del potencial genético del microorganismo diazotrofo, del hospedante, o de ambos (en caso de las simbiosis) y del ambiente (Graham, 1998).

Fisico-químicos

pH

Este factor afecta distintas etapas de la simbiosis:

La bacteria es muy sensible a la acidez, aunque diferentes cepas de una misma especie difieren marcadamente por su sensibilidad al pH. El encalado permite incrementos en la nodulación. Se seleccionan rhizobios por su resistencia a pH ácidos (pH 4,5).

Las leguminosas se afectan directamente por acción de altas concentraciones de H^+, o bien indirectamente por deficiencias (Ca, Mg) o toxicidad (Al, Mn). La FBN puede ocurrir a pH menores que los necesarios para la persistencia de la bacteria y la infección.

El encurvamiento de pelos capilares de *Medicago sativa por S. meliloti* se detuvo a pH 4,5 pero ocurrió cuando éste se elevó a 5,5. La iniciación de los nódulos y del cordón de infección son sensibles a la acidez algunas horas luego de que el encurvamiento se ha completado. Los niveles críticos de pH para la nodulación varían con las especies y aun dentro de estas, sitúandose entre pH 3,5 y 5,5, con mayor tolerancia en especies tropicales, como el caupi, productora de granos y estilosante, forrajera. La leguminosa puede aumentar el pH de su rizosfera, favoreciendo al rhizobio y la nodulación. La inoculación con altas dosis de rhizobios facilita la infección y la nodulación.

El **encalado** es el método más empleado para mejorar estos suelos. En Brasil se lograron grandes aumentos en los rendimientos por el encalado y la inoculación de leguminosa. El cuadro 9 muestra este efecto y la inoculación con *R. leguminosarum bv phaseoli* en poroto en suelos altamente ácidos de Colombia.

Temperatura y humedad

Los rhizobios son organismos mesófilos pero están sin embargo, distribuidos en todas las regiones del mundo. Difieren marcadamente en su tolerancia a elevadas temperaturas. En general, *S. meliloti* es la especie más tole-

rante a temperaturas elevadas, *R. leguminosarum* lo es menos y los rhizobios de leguminosas tropicales soportan amplio rango de temperatura.

Cuadro 9 - Efecto de la inoculación en *Phaseolus vulgaris* con rhizobios en suelos ácidos y encalados

cal ton/ha	rhizobio/g suelo inoculados	nódulos/ planta	N%
0	-	20,2	1,4
0,5	-	19,0	1,3
2	-	22,7	2,0
6	-	67,8	3,5
0	$3,5.\ 10^4$	23,1	2,5
0,5	“	23,4	2,4
2	“	30,0	3,2
6	“	56,8	3,0

La selección de rhizobios tolerantes a altas temperaturas y a la desecación es muy importante en la introducción de leguminosas forrajeras en regiones áridas y semiáridas, o de cultivos como soja o maní, en zonas áridas con irrigación. La unión con arcillas, como por ejemplo de montmorillonita, protege a las células y les confiere resistencia a altas temperaturas y desecación.

La simbiosis es más sensible a extremos de temperatura. Bajas temperaturas retardan la infección y formación de nódulos, en tanto que las altas temperaturas provocan nódulos poco eficientes.

Para las leguminosas tropicales, temperaturas diurnas de 25 a 32ºC son óptimas para nodulación, funcionamiento de la simbiosis y crecimiento de las plantas, con gran variación entre especies. Los algarrobos exiben un óptimo de 35ºC para la FBN.

El **nivel de agua** debe ser tal que no origine problemas de presión osmótica en la célula. En regiones tropicales con estaciones muy secas, el número de rhizobios en las cepas superficiales del suelo disminuye rápidamente. Con las lluvias, la recolonización puede ocurrir desde las capas más profundas.

La disminución del potencial hídrico del suelo limita también el transporte de los productos de la fijación a la planta y el flujo de fotosintetizados. Altas humedades limitan la aireación y la FBN. Algunos rhizobios con **nitrato reductasa desasimilativa (nir^-)** pueden sobrevivir en anaerobiosis. Los nódulos soportan poco tiempo el enegamiento (aumentan las lenticelas: expansiones de células epidérmicas que facilitan los intercambios gaseosos, o los espacios vacíos, con gases).

Los **nódulos en tallos** presentes en ciertas leguminosas, como *Sesbania rostrata***,** se independizan del problema del exceso de agua.

Salinidad

Los suelos se clasifican en salinos si su conductividad eléctrica es mayor que 4dS/m. Contienen además de sodio, un pH desfavorable, un desbalance de iones esenciales (P, Fe, Zn, Mn, Bo), una estructura y textura alterada que reduce la aireación y la retención de agua.

La tolerancia de los rhizobios a las sales varía mucho y de hecho las leguminosas y las plantas actinorríticas son más sensibles a la salinidad que la mayoría de las bacterias. Los hongos ectomicorrícicos pueden incrementar la resistencia a la salinidad de leguminosas noduladas.

Fuentes de carbono y energía

Los rhizobios introducidos en el suelo deben competir por los nutrientes del suelo. El uso eficiente de las fuentes naturales de carbono, energía y demás nutrientes, es de suma importancia para su persistencia. La **competencia saprofítica** es una de las cualidades que se les exige a las cepas para ser seleccionadas en la producción de inoculantes. Las leguminosas ejercen efectos estimulantes sobre la población de rhizobios, a través de sus exudados y descamaciones de tejidos.

El agregado al suelo de sustratos orgánicos, como abonos de granja estimulan a los rhizobios debido, tal vez, al efecto combinado de los nutrientes orgánicos e inorgánicos, modificaciones del pH, o aumentos en el nivel

de CO_2 del suelo. Como regla general, en suelos fértiles los rhizobios sobreviven por períodos considerables. Se informa una disminución de 10 veces en el número de *R. meliloti* luego de 14 años y un número variable de células se encontraron en suelo estéril, luego de más de 30 años.

La sobrevivencia de la bacteria depende del nivel introducido y del nivel de la población nativa: si ésta es alta, el inóculo puede fallar debido a la mortandad natural y a la competencia con la población nativa por el alimento y el espacio.

Fertilidad del suelo

Las leguminosas noduladas presentan requerimientos mayores de nutrientes en relación a las fertilizadas con nitrógeno combinado. Esto ocurre con los elementos que se encuentran en la nitrogenasa y otros sistemas enzimáticos, como el **Mo, Fe, S, Cu, Mg, Co**. La fertilización con fósforo, potasio, azufre, microelementos, afectan la sobrevivencia del rhizobio y la nodulación y FBN.

El **calcio** es un elemento que se requiere en alto nivel en leguminosas noduladas, sobre todo en las primeras etapas de la nodulación. Si el nivel es bajo, se inhibe el encurvamiento de los pelos y la nodulación. Al encalar suelos ácidos, el calcio agregado aumenta el pH, disminuyendo la solubilización de elementos tóxicos a altas concentraciones, como el Mn y el Al y se aumenta la solubilidad del Mo. Se incrementan también los bicarbonatos del suelo que favorecen el crecimiento del rhizobio en vida libre.

El **fósforo** constituye un elemento necesario para la leguminosa y la FBN y como su disponibilidad es baja en muchos suelos agrícolas; la incorporación en la siembra es práctica corriente. Las micorrizas contribuyen a su absorción y las raíces de la leguminosas son muy micorrizadas.

El **molibdeno** (Mo) es un elemento clave en la nitrogenasa, responsable de la transferencia de electrones de la reductasa de la nitrogenasa (Fe-proteína) hacia el N_2. Su nivel puede ser limitante en suelos tropicales y es aconsejable incluirlo en una fertilización basal.

El **cobalto** (Co), **hierro** (Fe) y **magnesio** (Mg) son importantes en el funcionamiento de la nitrogenasa y para la planta, por lo que los requerimientos en leguminosas noduladas se incrementan.

El **nitrógeno combinado** afecta el desarrollo de los nódulos y la fijación del N_2. Es bien conocida la inhibición de la nodulación por los iones nitrato o amonio, aunque las leguminosas difieren en la susceptibilidad a estos compuestos. Se citan numerosas experiencias en la bibliografía sobre los niveles mínimos de iones amonio que no inhiben a la nitrogenasa; en general, **40 mg/kg de N-NH_4^+** son tolerados, pero cantidades superiores a 100 mg/kg inhiben la fijación en la rizosfera, efecto que ha sido relacionado con inhibición en la producción de fitohormonas cerca del sitio de infección.

El crecimiento de los nódulos es más sensible al exceso de N que la nitrogenasa y ambos son más sensibles que la infección y los eventos iniciales de la nodulación. La figura 7 muestra la sensibilidad al nitrato de amonio de algunas cepas de *R. leguminosarum* y la importancia de la selección de cepas que mantengan la fijación del N_2 en presencia de N-combinado.

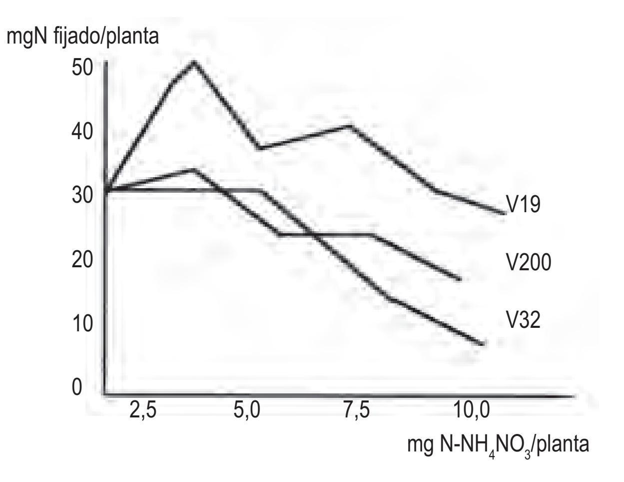


Figura 7- Efecto del nitrato de amonio en la fijación de N_2 de *Vicia atropurpurea* inoculada con varias cepas de rhizobio

Un exceso de nitratos disminuye la deformación de pelos capilares, la adhersión a sus paredes, el número de

cordones de infección y aumenta el número de abortos de eventos iniciales de la infección. Uno de los mecanismos de inhibición podría ser por inactivación del ácido indol-acético (AIA), fitohormona involucrada en la colonización, por los nitritos producidos por reducción biológica de los nitratos. Los nitritos también inactivan a la leghemoglobina.

El amonio es asimilado inmediatamente, pero el nitrato requiere un período de tiempo antes de ser asimilado, coincidente con su reducción por nitrato reductasas. El exceso de amonio, o de glutamina, reprime la producción y actividad de la nitrogenasa. Con alta disponibildiad de N en la parte aérea se disminuye el nivel de fotosintetizados que llegan al nódulo. *Sesbania rostrata* es una leguminosa que produce **nódulos en raíces y tallos**, presentó marcada inhibición de los nódulos radicales por la presencia de nitrato de amonio, pero los nódulos del tallo no fueron afectados y redujeron activamente el acetileno. Esta planta posee una alternativa para evitar la inhibición de la nodulación radical y se amplía el conocimiento sobre especies de leguminosas y de plantas actinorríticas (simbiosis con *Frankia*) que pueden formar nódulos en tallos.

Interesa en muchos casos complementar el aporte de N por FBN con una fertilización con N combinado. Es necesario analizar el período de mayor fijación a los efectos de incorporarlo antes o después (evaluación actividades de nitrogenasa y nitratoreductasa). La inhibición por nitratos es afectada por la combinación rhizobio-leguminosa. El empleo de mutantes **nitrato-reductasa negativas,** incapaces de reducir nitratos, ofrecen la alternativa de seguir fijando N_2 en presencia de $N\text{-}NO_3^-$

Polución

El uso indiscriminado de herbicidas, fungicidas, la acumulación de sales de metales pesados en suelos y aguas resulta perjudicial para el rhizobio. Se han descrito diversas técnicas de incorporación de biocidas a las semillas evitando su íntimo contacto con la bacteria. A pesar de la multiplicidad de resultados obtenidos, se piensa que los pesticidas aplicados en dosis aconsejadas no perjudican al rhizobio.

De manera general, los fungicidas son más perjudiciales, seguido de los herbicidas y los insecticidas. Se seleccionan mutantes de rhizobio altamente efectivas en la fijación del N_2, resistentes a altos niveles de pesticidas, sobre todo a los fungicidas que son aplicados directamente sobre las semillas.

Productos de la fotosíntesis

La fotosíntesis provee energía y poder reductor para la fijación del N_2 y los esqueletos carbonados para la formación de aminoácidos, amidas, etc., fuentes de nitrógeno para la leguminosa. Las leguminosas noduladas requieren iluminación adecuada para mantener una activa fijación. Son muy conocidos los experimentos que muestran las fluctuaciones de la actividad nitrogenasa de nódulos por cambios en la iluminación, o cuando se corta la parte aérea o se sombrean los cultivos.

Si se incrementa el nivel de CO_2 de la parte aérea de plantas de soja (con envoltorios transparentes) la fijación del N_2 a los 40 días de la siembra se estimuló más de 4 veces (evaluada por reducción del acetileno a etileno). Pero en la práctica resulta muy difícil regular el nivel de CO_2 sobre un cultivo, salvo manejando las densidades de siembra, la competencia entre plantas.

Con elementos marcados se mostró la translocación de productos de la fotosíntesis hacia los nódulos: sacarosa, glucosa, ácidos orgánicos y se calculó el costo respiratorio de la fijación del N_2 en soja, caupí y trébol blanco, con mucha similitud en las tres leguminosas: entre 6,3 y 6,8 mg C/mg N fijado. Consideraciones bioquímicas y teóricas indican que la reducción del N_2 a NH_3 resultaría de un costo mínimo respiratorio de unos 2C/1N, excluyendo los gastos por la conversión del amonio en otros compuestos y aquellos involucrados en el desarrollo y mantención de los nódulos.

Si se consideran los costos de la FBN y el transporte, la cifra puede superar el **33% de los fotosintetizados** que son translocados hacia los nódulos: un 5% se emplea en el desarrollo de los nódulos, un 12% se respira como CO_2 y un 15% se reexporta hacia el huésped con el N fijado.

Factores biológicos

Se han aislado de la rizosfera o del rizoplano cierto número de bacterias, hongos y sobre todo actinomicetes, que se muestran antagónicos frente al rhizobio *in vitro*. Este antagonismo puede deberse a competencia por los nutrientes, acidificación, producción de antibióticos u otras sustancias, y aun a la predación por protozoos o a la infección por fagos líticos.

Muchas veces un inoculante desaparece en el suelo. La causa precisa, de origen biológico, es difícil de determinar. Una bacteria predatora que lisa ciertas cepas de rhizobio ha sido identificada (*Bdellovibrio bacteriovorus*) (Capítulo 14). Este parásito afecta a los rhizobios en el suelo cuando la densidad de la presa es alta. La población afectada puede aun mantenerse a niveles aceptables para nodular leguminosas (10^4-10^5 células/ml), de modo que las frecuentes desapariciones de rhizobios introducidos en el suelo, no pueden explicarse exclusivamente por las actividades de este microparásito.

Los **fagos líticos** fueron motivo de numerosos estudios, sobre todo en suelos donde las pasturas fracasaban en la nodulación luego del segundo año de instaladas. El problema de la decadencia de los alfalfares fue atribuído, en parte a la acción de estos parásitos intracelulares.

Las **bacteriocinas** constituyen un grupo de sustancias, sobre todo proteínas, péptidos, producidas por muchas bacterias que afectan a organismos muy relacionados, incluso de la misma especie, a diferencia de los antibióticos, que poseen un espectro de acción más amplio.

Las **rhizobiocinas** han sido descritas como elemento de lucha biológica que permite la supremacía de la célula productora frente a la población de rhizobios nativos del suelo. Para algunos autores serían partículas defectuosas de fagos, pues se parecen a las colas de ciertos virus de *E. coli*, y su síntesis está muchas veces mediatizada por plásmidos.

Distintos patógenos pueden afectar directamente a la FBN atacando nódulos (insectos) o indirectamente afectando el crecimiento de las plantas, como los nemátodos. La figura 8 muestra la sobrevivencia de *R. leguminosarum bv trifolii y S. meliloti* en suelo estéril y no estéril. Se observa que estas bacterias mantienen alta densidad en suelo estéril y declinan lentamente en suelo no estéril, debido a interacciones biológicas. La selección de cepas buenas competidoras en los suelos donde va a ser empleada, es un requisito importante cuando se desea éxito en la colonización temprana de raíces de plántulas inoculadas.

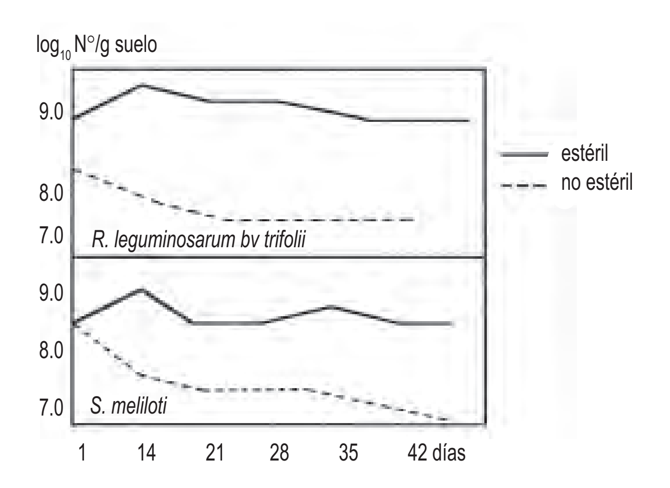


Figura 8- Sobrevivencia de *R. leguminosarum bv trifolii y S. meliloti* en suelo estéril y no estéril

Inoculación de las leguminosas

La fijación biológica del nitrógeno por la simbiosis rhizobio-leguminosa compite económicamente con la fertilización nitrogenada. Si bien las gramíneas fertilizadas con nitrógeno producen más materia seca por su mayor eficiencia fotosintética, la siembra de leguminosas se incrementa en el mundo, ya sea por la calidad nutritiva de sus granos (soja, maní, leguminosas tropicales), por su aporte en forrajes y sobre todo cuando se desea recuperar suelos muy degradados.

En muchos suelos el nivel y la eficiencia de las cepas nativas pueden no ser los adecuados y la nodulación y la fijación del N_2 resultar insuficientes para satisfacer las demandas del cultivo.

Desde muy antiguamente se practica la **inoculación artificial** de las semillas o del suelo en donde se van a intro-

ducir las leguminosas. Esta técnica resulta imprescindible cuando se introducen nuevas leguminosas, sobre todo si son huéspedes de alta especificidad (*Trifolium, Medicago, Glycine)*, cuando la población nativa es ineficiente o cuando la deficiencia en nitrógeno limita el desarrollo vegetal.

Requisitos para el éxito de la inoculación:

- que la semilla inoculada posea la bacteria adecuada en número suficiente
- que el método y las condiciones de inoculación permitan la sobrevivencia de las bacterias
- que las condiciones del suelo próximo a la semilla permitan la colonización de los rhizobios en la rizosfera, la formación de los nódulos y su funcionamiento efectivo.

Técnicas de inoculación

- **natural:** en la antigüedad, los agricultores mezclaban las semillas con tierra de plantíos de leguminosas, asegurándose la nodulación
- **inoculantes comerciales** productos con alta densidad de cultivos específicos de rhizobios en diversos soportes, en general turba estéril o en cultivos líquidos. La dificultad en algunos países para obtener turbas de buena calidad, obliga a la búsqueda de sustitutos, como tierra de diatomeas, bagazo de caña, grava, etc.

Establecimiento de la necesidad de inoculación

La colección y selección de cepas de rhizobio puede resultar inútil si las leguminosas nodulan eficientemente con poblaciones nativas, situación frecuentemente encontrada en leguminosas tropicales, que nodulan con el mismo tipo de rhizobio o si el suelo contiene alto nivel de nitrógeno combinado. Se emplea un ensayo simple de campo en parcelas con 3 tratamientos, para determinar la necesidad de inoculación:

1. testigo sin inocular para evidenciar la presencia y eficiencia de cepas nativas **(T)**

2. inoculada con una cepa potencialmente eficiente y seleccionada en ensayos te invernáculo o que es empleada con éxito en otra región **(I)**

3. fertilizada con dosis óptmas de N inorgánico **(N)**, puede ser incluso inoculada, donde se logra el máximo desarrollo

Ejemplos de resultados

La figura 9 presenta algunas de las respuestas posibles.

- Rendimiento similar en los tres tratamientos y buena nodulación en los testigos, indica abundante y eficiente población nativa de rhizobios específicos para la leguminosa, no se aconseja la inoculación **(caso A)**
- Los testigos crecen pobremente y con nódulos inefectivos, mientras que los inoculados lo hacen bien y con abundante nodulación, indican buena respuesta a la inoculación **(caso B)**

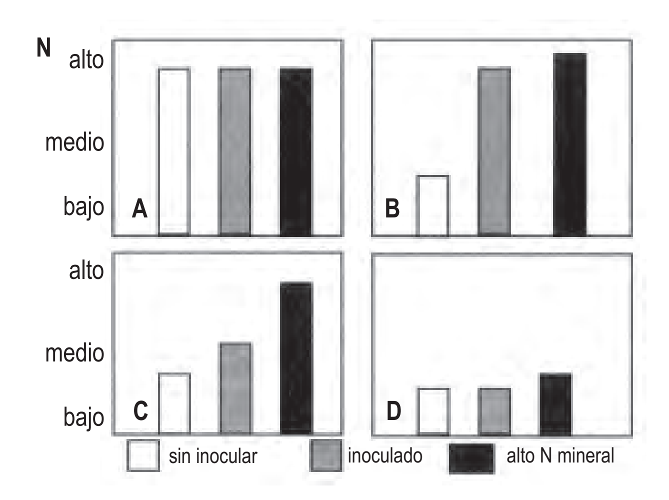


Figura 9- Ensayo de campo para determinar la necesidad de inoculación de leguminosas

- Poco desarrollo en el inoculado, pero buena respuesta a la fertilización, se supone que la cepa no es la adecuada o que la calidad del inoculante no es buena. En este caso es necesario plantearse una selección de cepas ya sea a partir de nódulos de buenas plantas de

otras regiones y de cepas seleccionadas por centros de colección del país o del exterior **(caso C)**

- Falta de nodulación y pobre desarrollo vegetal en el testigo, indican carencia de rhizobios nativos y si no hay respuesta a los otros dos tratamientos se debe suponer que otros factores, excluyendo el N, como el P, S, Fe, etc. limitan el crecimiento vegetal **(caso D)**

Este mismo ensayo se emplea para evaluar el efecto de otros nutrientes, como por ejemplo, el fósforo o microelementos, mediante el diseño de parcelas divididas. El ensayo se instala en condiciones óptimas para el desarrollo vegetal, en general con una fertilización mínima basal.

Una vez establecida la necesidad de inoculación, se determina los **criterios para la selección de cepas** apropiadas para el huésped en cuestión. Las cepas usadas en los inoculantes deben ser cuidadosamente seleccionadas y mantenidas, deben probarse anualmente para minimizar las posibilidades de cambios en las propiedades simbióticas.

Cualidades de una cepa de rhizobio para su recomendación en la fabricación de inoculantes:

- **efectividad en la fijación del N_2**, la más importante de las propiedades, las cepas deben superar significativamente al testigo **(T)** en ensayos de laboratorio, invernáculo y campo

- **competencia en la rizosfera o** competencia saprofítica, le permite a la bacteria soportar las condiciones físico-químicas del medio, emplear eficientemente los nutrientes disponibles y lograr imponerse a la población nativa

- **otros requisitos**: **infectividad** o sea buena capacidad para formar nódulos rápidamente, **adaptación a circunstancias especiales,** como bajos pH, tratamientos pesticidas, salinidad, capacidad para nodular a bajas temperaturas, con altos niveles de nitrógeno combinado, etc.

- **hidrogenasa:** le permite reciclar el H_2 liberado en la FBN, derivando los electrones liberados hacia la nitrogenasa

- **rápido crecimiento en medios de cultivo simples** y la sobrevivencia en los soportes más empleados, son importantes ventajas que facilitarán la preparación de inoculantes

- **estabilidad genética**, que no sufra frecuentes mutaciones en la conservación en el laboratorio

En la recomendación de inoculantes se pueden dar alternativas:

- aconsejar el uso de **varios inoculantes**, cada uno con una cepa altamente efectiva para especies individuales

- empleo de cepas de «amplio espectro» que fijan N_2 con amplio rango de leguminosas

- aconsejar el uso de inoculantes con varias cepas, o **polivalentes**, que incluyan a las mejores cepas para cada especie del huésped

La tendencia en general es a la producción de inoculantes con cepas de **amplio espectro**, de utilidad en vastas regiones del país e incluso a nivel regional. Esta práctica evita también la introducción de muchas cepas que con el tiempo se pueden volver ineficientes, pero manteniendo su infectividad, se comportan casi como **parásitas.** Pueden presentarse situaciones en las que se justifica la producción de inoculantes a nivel local, cuando las características de la zona y la importancia de las variedades empleadas así lo justifiquen.

La inoculación puede resultar imprescindible cuando se desea introducir una variedad o un cultivo nuevo en una región. Resulta de importancia seleccionar cepas eficientes a partir de los **rhizobios nativos**, bien adaptados a las condiciones ecológicas de la región.

La tarea de **extensión** es muy importante y el productor debe conocer los beneficios que redundan de una buena inoculación.

Respuesta a la inoculación

- **población nativa de rhizobios es escasa o nula** o ineficiente, se obtienen en esta situación muy buenos resultados. Esto ocurre con el cultivo de soja en suelos sin

historia previa y donde se inocula en un casi 100% pues *B.japonicum* no se encuentra o está presente en niveles bajos.

- **población nativa de cepas específicas de eficiencia moderada,** resulta muchas veces difícil incrementar los rendimientos por inoculación.

- **alta población nativa con baja especificidad,** como ocurre con cultivos de leguminosas tropicales arbóreas que nodulan con el mismo tipo de rhizobio, de baja especificidad. Este es el caso del maní, que presenta abundante nodulación nativa en amplias regiones del centro de Argentina. La selección de cepas más eficientes entre las nativas, bien adaptadas a la zona y una inoculación masiva puede redundar en incrementos en este importante cultivo oleaginoso.

El cuadro 10 presenta los resultados de un ensayo de campo donde se observa abundante nodulación de las parcelas testigo, reflejo de la alta densidad de cepas nativas. Sin embargo, en la cosecha se apreció efecto positivo de la inoculación por cepas seleccionadas en el peso de cajas y en la producción de N.

Cuadro 10- Inoculación en maní (*Arachis hypogea,L)*

Tratamiento	Peso cajas kg/ha	Grano	N%	kgN/ha
testigo	2.115b	1.379b	4,77	65.76b
urea 70kgN/ha	3.590a	2.342a	4.34	101,64a
M-4	2.853a	1.822a	4,74	86,36a
M-13	2.679a	1.500ab	4,61	69,56a
M-10	2.673a	1.560ab	4.62	72,07a

Dos o más tratamientos señalados por la misma letra no difieren por Tuckey al 5%. M-4, M-10 y M-13 son aislamientos de la zona

Uso de los inoculantes

Los aspectos relacionados a la selección de cepas para recomendar en un inoculante para leguminosa, el cultivo del inóculo y la formulación de distintos tipos de inoculantes son tratados en el Anexo práctico, así como las prácticas referentes al control de calidad de estos productos biológicos. Los principales puntos a tener en cuenta al inocular una leguminosa son:

- **empleo de inoculantes a base de turba** que aseguran buena sobrevivencia en la semilla hasta la germinación. La esterilidad de la turba permite extender los plazos de vencimiento (cuadro 11). Las formas pildorizadas que emplean adhesivos como goma arábiga o derivados celulósicos, para lograr mayor contacto con la semilla, que se recubre con carbonato de calcio y fosfato de roca, mejoran la inoculación.

- **biocidas y fertilizantes:** asegurarse que las semillas no hayan sido tratadas con sustancias tóxicos y fertilizantes y que los recipientes empleados en la inoculación están libres de aceites, petróleo, metales pesados, etc.

- **conservación:** mantener el inoculante en ambiente fresco, en lo posible en el refrigerador hasta su uso. No emplear inoculantes vencidos.

- **inoculación y siembra simultáneas**: sembrar lo más pronto posible luego de la inoculación, y si se pildorizó, no más de unos días después.

- **condiciones de siembra**: sembrar en suelo húmedo y si la temperatura es muy alta, hacerlo al final de la tarde.

Cuadro 11 - Efecto de la esterilización de la turba en la sobrevivencia de rhizobio (x 10^6/g), luego de 4 y 26 semanas

	4 semanas			26 semanas		
Cultivo	A	B	C	A	B	C
R. leguminosarum bv trifolii TA1	660	990	110	6	79	2,8
S. meliloti SU47	1500	1800	697	180	170	5,3
Bradyrhizobium CB 756	1100	1200	16	25	190	1,0

A= esterilización en autoclave
B= esterilización por rayos gama
C= turba no estéril

Fijación de nitrógeno por leguminosas

La cantidad de nitrógeno tomada por una leguminosa varía considerablemente con la especie, la efectividad de la simbiosis, las condiciones del ambiente, del manejo, etc.

El cuadro 12 presenta valores sobre la fijación en diferentes especies. La cantidad derivada del aire varía y representa en general un 50% del total en suelos fértiles, es mayor en suelos deficientes y menor con fertilización nitrogenada. En asociaciones con gramíneas la proporción derivada de la fijación puede llegar al 80 o 90% pues el cultivo asociado toma la mayoría del nitrógeno disponible en el suelo.

Cuadro 12 - Nitrógeno fijado por leguminosas (kg/ha/año)

Forrajeras	
Templadas	
Medicago sativa (alfalfa)	177
Trifolium platense (trébol rojo)	115
Trifolim repens (trébol blanco)	149
legum.consociadas(pradera mixta)	125
Melilotus alba (trébol de olor, blanco)	104
Medicago polymorpha (trébol carretilla)	63
Trifolium subterraneum (trébol subterráneo)	24
Lotus corniculatus(cuernecillo)	27
Tropicales	
Centrosema pubesens(centro)	112
Stylosanthes guianensis	115
Neonotonia wightii	160-450
Leguminosas de grano	
templadas	
Vicia	57-190
Phaseolus vulgaris (poroto)	46
Lupinus sp.. (lupino)	128
Tropicales	
Vigna unguiculata	35 - 77
Glycine max (soja)	17-124
Arachis hipogea (mani)	33-117

El N de las leguminosas puede transferirse a otros cultivos en mayor o menor grado por las siguientes vías:

- **excreción de compuestos nitrogenados** por los nódulos y raíces
- **pastoreo animal**
- **descomposición de parte aérea de la planta**

Se citan valores de N% en distintas partes de una leguminosa, evaluado en floración o hacia el final de ésta: hojas (2,6-5,0); tallos (1,2-1,8), raíces (1,6-2,4), nódulos (3,9-6,5), vainas (3,1-4,2) y en la planta entera en leguminosas tropicales (2,0-3,0).

Perspectivas

Algunos de las prioridades en la investigación en el tema se pueden resumir:

- incorporar leguminosas no tradicionales en ensayos de adaptación como forrajeras perennes: *Desmodium intortum, Leucaena leucocephala, Lotenis bainesii, Noenotonia wightii, Macroptilium atropurpureum*

- extender las investigaciones sobre la fijación del N_2 en **leguminosas arbóreas**, importantes en la fijación de suelos arenosos, erosionados, con incremento del nivel de materia orgánica (Dommergues, 1995, Frioni *et al,* 1998 a y b)
- estudiar **leguminosas indígenas**, bien adaptadas a determinadas zonas ecológicas, pero no explotadas a nivel agrícola
- evaluar la simbiosis triple: leguminosa-rhizobio-hongo micorrítico
- **mejorar genéticamente** a los diazotrofos: el aumento de la efectividad de los sistemas existentes se puede alcanzar manipulando los genes **nif** responsables de la fijación del N_2, construyendo nuevos organismos fijadores por transferencia de los genes

- seleccionar **mutantes de rhizobios** que pueden fijar N_2 en presencia de **altos niveles de N combinado** y con una **hidrogenasa funcional** que le permita reciclar los ATP, permiten mayores rendimientos en la fijación

- aumentar la eficiencia en la **toma de metales** como el Mo y el Fe

- seleccionar **genotipos del huésped** por su mayor actividad reductora del acetileno en presencia de una mezcla comercial de cepas de rhizobio. Explorar especies con nódulos en los tallos

- transferir **genes nif** a mitocondrias o cloroplastos vegetales es otra de las aspiraciones de los genetistas. Se piensa que los **nif** penetran en los vegetales frecuentemente por heridas o llevados por parásitos. El problema radica en el mantenimiento de estos genes y su funcionamiento dentro del organismo superior. Se piensa también en su introducción en microorganismos del **rumen**

- obtener **hibridos por fusión somática:** células de una hoja pueden ser inducidas a fusionarse y regenerar plantas completas. Está en la especulación de muchos científicos producir un cereal que forme nódulos fijadores de N_2.

Pero, muy acertadamente, se señala las consecuencias de una alteración tan brusca de los sistemas simbióticos naturales. Los especialistas del ambiente temen que malas hierbas exuberantes, fijadoras del N_2, alteren el equilibrio biológico. Otros elementos, además, pasarían a ser limitantes: P, K, S, e incluso el CO_2. Sería también peligrosa la propagación de microorganismos patógenos con genes **nif**.

Sin embargo, todos estos llamados de atención no pueden detener las investigaciones sobre aspectos vinculados a la **FBN**, ante la necesidad de alimentar a la creciente población mundial. El cuadro 13 señala algunas de los enfoques en la investigación en este tema.

La simbiosis rhizobio-*Parasponia*

Hasta no hace mucho tiempo se pensaba que los rhizobios formaban nódulos solamente con leguminosas. En 1973 se describió nodulación en ciertas *Ulmaceae*, por rhizobios. Son árboles muy altos, ampliamente distribuidos en el trópico, identificados primeramente como del género *Trema, como T. cannabina*, cuyo endofito bacteriano logró infectar varias leguminosas.

Cuadro 13 - Estrategias para optimizar la fijación del N_2

1. Selección de la planta huésped
criterios de selección
- alto potencial de fijación de N_2 en simbiosis
- crecimiento rápido
- raíces profundas
- competencia interespecífica reducida
- tolerancia limitaciones del ambiente: salinidad, sequedad
- nodulación aérea (en casos específicos)

métodos de selección
- manejo para incrementar la FBN
- ensayos de orígenes o individuos y su propagación vegetativa,
- elección de las mejores combinaciones: rhizobio-leguminosa, *Frankia*- no-leguminosa
- transferencia de genes

2. Selección de cepas compatibles de *Rhizobium o Frankia*
criterios de selección
- alta efectividad
- habilidad competitiva
- tolerancia a limitantes del medio
- capacidad de afectar la fisiología de la planta

métodos de selección
- estudios en cepas salvajes
- construcción de nuevas cepas

inoculación
- cultivo de rhizobio o frankia
- procesamiento de inoculantes

3. Levantamiento de limitantes
sequía
- irrigación

deficiencia de nutrientes
- fertilización y micorrización

factores biológicos desfavorables
- control químico (pesticidas) o control biológico
- esterilización (solarización)

Estudios posteriores mostraron que estos especímenes estaban incorrectamente identificados y que pertenecen en realidad al género *Parasponia*, sobre todo *P. rugosa*. *Parasponia* es nativa del sudeste asiático, son árboles de hasta unos 15 m, pioneros en suelos de montaña de Malasia, Indonesia y Nueva Guinea. Tres especies presentan nódulos: *P. rugosa, P. parviflora y P. andersonii,* empleadas desde muy antiguo como abono verde en Java. El endosimbionte se identificó como *Bradyrhizobium spp* de crecimiento lento, el más promiscuo y tal vez el más antiguo de los rhizobios, que inocula cruzado con *Vigna unguiculata*. Los nódulos de *Parasponia* fijan nitrógeno en rangos comparables a los nódulos perennes de otras no leguminosas.

Diferencias con nódulos de las leguminosas:

- el rhizobio se encuentra preferencialmente dentro de un cordón de infección altamente ramificado y **pocas bacterias se liberan de él y se diferencian en bacteroides**. En las leguminosas, la mayoría de los rhizobios se transforman en bacteroides

- los nódulos de *Parasponia* **no poseen leghemoglobina**, lo que muestra claramente que tanto la formación de bacteroides como la síntesis de leghemoglobina, están determinados por el hospedante. La masa coraloide puede alcanzar tamaños de hasta 6 cm de diámetro y se parecen más a los nódulos actinorríticos de *Coriaria o Datisca* que a los de las leguminosas

- la zona infectada suele presentar forma de herradura, donde coexisten células hipertrofiadas, con la bacteria y células menores, libres de endofito. Pueden presentarse capas con células oscuras, posiblemente con compuestos polifenoles y taninos

Parasponia, como *Casuarina* y árboles leguminosos crecen rápidamente en suelos vírgenes del sudeste de Asia y juegan importante papel en la reforestación de suelos erosionados, donde son empleados desde muy antiguamente.

Simbiosis con nódulos con *Nostoc y Anabaena* (cianobacterias)

Las cianobacterias por su doble aptitud de fotosintetizar y de fijar N_2, son especies típicamente pioneras. Sin embargo, muchas de ellas establecen asociaciones simbióticas variadas, con hongos, en los líquenes, con hepáticas, musgos, con el helecho acuático *Azolla* y una angiosperma, *Gunnera.*

Cycas

Las *Cycadales* son consideradas gimnospermas primitivas, reliquias de una flora tropical muy antigua: su origen se ubica en los períodos Triásico, Jurásico y Cretáceo. Se piensa que jugaron importante rol en el ciclo del nitrógeno de esas épocas. De las 90 especies actuales (9 géneros), sólo algunas, como *Macrozamia*, se desarrollan en Australia a un nivel suficiente como para intervenir activamente en el ciclo del nitrógeno. No han sido muy estudiadas y muchos aspectos relativos al proceso de infección y a la naturaleza de la especificidad hospedante-endofito, no han sido aclarados.

Desarrollo y estructura de los nódulos: se parecen superficialmente a los de no-leguminosas angiospermas, pero su formación y estructura varían. Se originan a partir de raíces especializadas, llamadas **coraloides**, que presentan estructuras del tipo nodular aún antes de ser colonizadas por la cianobacteria, inducidas posiblemente por bacterias. Los nódulos se inician en la raíz embrional y el hipocótilo y recién luego de su emergencia son infectados por cianobacterias heterocísticas de los géneros *Nostoc y Anabaena,* por rupturas de los estratos superficiales.

Las raíces coraloides se desarrollan en forma de grandes racimos y pierden su característico geotropismo negativo. Las raíces no infectadas permanecen pequeñas y mueren en el correr del año. Todos los aislamientos mostraron capacidad para fijar N_2.

En Argentina se describió nodulación en ejemplares de *Cyca revoluta* cultivada en parques y jardines. La fijación en cultivos de *Cycas spp. y Macrozamia spp* se realiza tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Los productos de la fijación son transportados al hospedante y se piensa que gran parte es exudado por el endosimbionte, a diferencia de lo que ocurre con la cinobacterias en vida libre. Las causas de mayor exudación podrían deberse a:

- mayor actividad nitrogenásica del endosimbionte

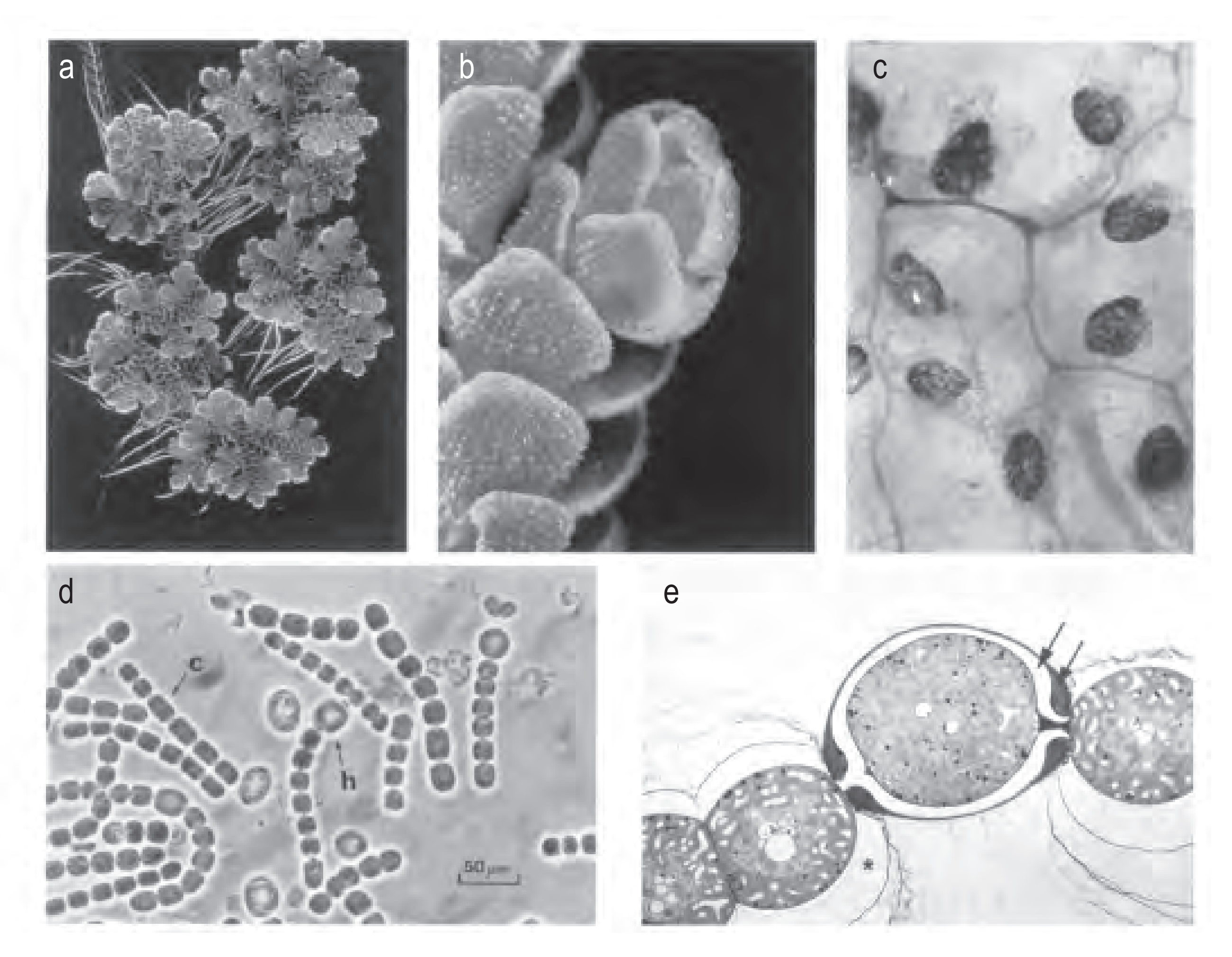


Figura 10- La simbiosis *Azolla-Anabaena*. a) Morfología de hojas de *Azolla*, b) Racimo de hojas de *Azolla*, c) Poros con *Anabaena* luego de acción de pectinasas, d) *Anabaena*: h= heterocisto, c= célula vegetativa, e) heterocisto de *Nostoc* con gruesa pared de varias capas (flecha) y la pared externa muscilaginosa, menos densa (*).

- una capacidad limitada para almacenar nitrógeno como ficocianina

Azolla

La simbiosis *Azolla-Anabaena* es ecológicamente la más importante, muy abundante en aguas calmas templadas y tropicales. La cianobacteria se encuentra en poros ubicados en cara ventral de las hojas, que se cierran en hojas maduras. Se han contado hasta 2.000 a 5.000 células de *Anabaena azollae* en una sola cavidad. La fijación del N_2 tiene lugar en los heterocistos que representan entre el 20 y 30% de células de la cianobacteria y están rodeados de gruesas paredes (figura 10: a, b, c y d Franche *et al.,* 1998; e, Selosse, 1996). En el filamento ocurre fotosíntesis y en los heterocistos, que carecen de fotosistema II, se expresa la nitrogenasa.

Azolla se usa como biofertilizante en vastas regiones de Asia, Africa, como abono verde. Se cultiva en estanques y luego se libera con el agua que inunda el arroz. La inoculación puede aumentar los rendimientos entre un 30 y 50%. La agricultura cada vez más intensiva y la fertiliza-

Nodulación

- El nódulo es un órgano compuesto de unidades elementales llamadas **lóbulos nodulares**, cada uno originado por invasión de frankia en raíces adventicias. En función de variaciones del ambiente, se van formando nuevos lóbulos, lo que origina un nódulo muy grande, de aspecto coraloide, que se va lignificando. Un nódulo puede persistir durante 5 a 10 años, en ese caso sólo los lóbulos periféricos son activos
- Cada lóbulo es una raíz modificada: su vascularización es central y como las raíces adventicias o laterales, se origina en el periciclo (figura 11) (Dommergues *et al.*, 1999)
- Los lóbulos son invadidos, en su corteza, por el microsimbionte *Frankia*, que penetra las células vegetales y asegura la fijación de N_2

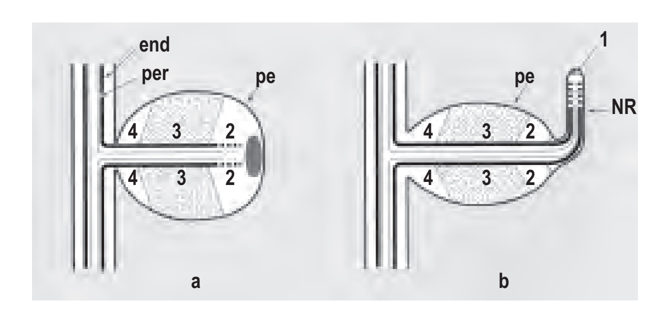


Figura 11- Estructura de nódulos actinorríticos: a) lóbulo tipo *Alnus*, b) tipo *Myrica* y *Casuarina,* con raíz nodular. En ambos tipos los vasos son centrales, con endodermis (end), periciclo (per) y periderma (pe). El parénquima cortical colonizado presenta 4 zonas:meristemática (1), de infección (2), de fijación (3) y de senescencia (4).

Se distinguen dos tipos de nódulos: los de tipo coraloide, como los de *Alnus* donde el meristema nodular cesa su actividad una vez que el lóbulo se formó y los de tipo *Casuarina, Eleagnus, Myrica* , en los cuales el meristema del lóbulo continúa con un desarrollo modificado que conduce a la formación de una raíz nodular con geotropismo negativo, la cual puede a su vez ser colonizada.

La figura 12 muestra nódulos jóvenes de *Casuarina* y *Allocasuarina* y nódulos de varios años donde se aprecia la suberización (Duhoux y Nicole, 2004).

Formación de los nódulos: el proceso ha sido más estudiado con *Alnus glutinosa* y pueden distinguirse 4 fases:

a. desarrollo del endofito en la rizosfera

b. invasión de pelos capilares

c. formación de nódulos primarios

d. formación de nódulos verdaderos, por ramificaciones dicotómicas de meristemas apicales, dando el aspecto racimoso característico de estos nódulos

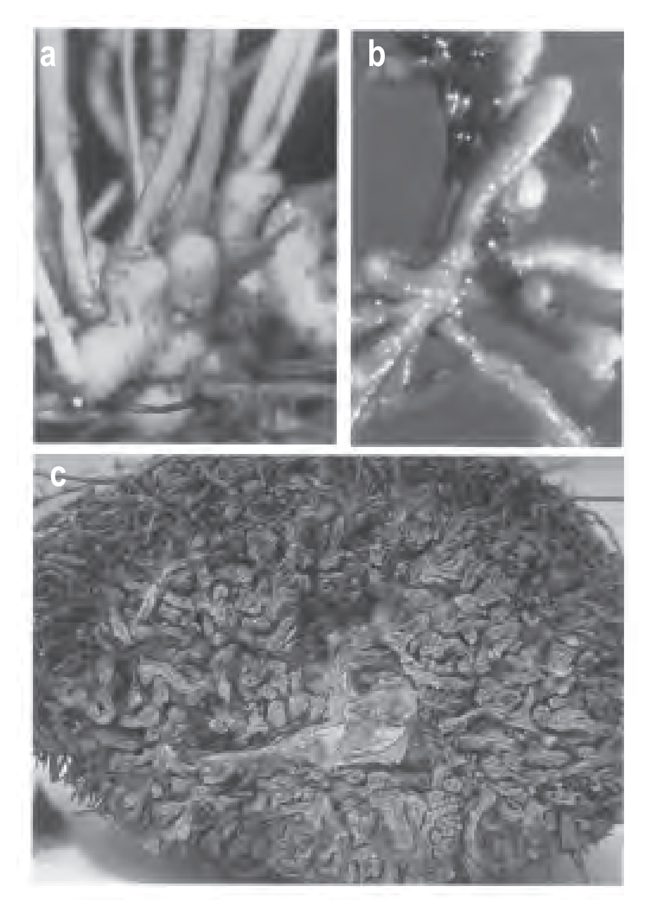


Figura 12- Nódulos actinorríticos: a) nódulos jóvenes de *Casuarina glauca*, b) nódulo jóven de *Allocasuarina verticillata*, c) nódulo viejo de *Casuarina.*

ción han sustituido esta práctica, llamada también azollización.

Asociaciones con *Frankia* spp

Después de las leguminosas, las plantas actinorríticas constituyen el segundo grupos importante (260 a 280 especies) de plantas fijadoras de nitrógeno. Pertenecen a unas 10 familias de las Espermatófitas con unos 24 géneros que contribuyen a la economía de este elemento en zonas erosionales, en suelos pobres, en donde se desarrollan como vegetación pionera. Todos los géneros de una misma familia no son necesariamente nodulados y se encuentran igualmente especies no noduladas en el interior de un mismo género.

Todas las actinorrizas albergan bacterias pertenecientes a un mismo género, un actinomicete simbiótico del género ***Frankia***, fijador de N_2 que fue confundido primeramente con un hongo, por su carácter filamentoso. Quizá la primera descripción de nódulos radicales en estas plantas se remonta a 1895 en *Alnus glutinosa*, cuyo desarrollo y N en el follaje se correlacionaron con el número de nódulos.

Estas asociaciones recibieron diferentes nombres: simbiosis tipo *Alnus*, simbiosis con actinomicetes y más recientemente **actinorrizas**, por analogía con las micorrizas (simbiosis con hongos).

El cuadro 14 presenta las principales especies descriptas. Son frecuentemente especies leñosas presentes al estado espontáneo en todos los continentes y climas, desde el ártico al subtropical. Son, sin embargo más frecuentes como árboles o arbustos que juegan importante rol en la economía del nitrógeno en bosques de zona templada fría. Su distribución es menor en la región tropical. Estas plantas son escasamente mencionadas en los textos básicos de biología o ecología, a pesar de que son importantes componentes de ecosistemas de vastas regiones y muchas de ellas muy empleadas en forestación. Esta vegetación es tolerante a suelos de baja fertilidad, como dunas arenosas, zonas quemadas, suelos erosionados y muchas resisten la salinidad.

Se piensa que la nodulación puede ocurrir en géneros aún no estudiados. Un ejemplo de esto es el descubrimiento de actinorrizas en *Trevoa*, miembro de *Colletieae* y en *Datisca glomerata*, relacionada a *D. cannabina*, aunque de distribución geográfica muy diferente.

Cuadro 14 – Principales especies actinorríticas

Familia	Géneros
Betulaceae	*Alnus (aliso)*
Casuarinaceae	*Allocasurina, Casuriana, Gymnostoma, Ceuthostoma*
Coriaceae	*Coriaria*
Datiscaceae	*Datisca*
Eleagnaceae	*Eleagnus, Hippophae, Shepherdia*
Myricaceae	*Comptonia, Myrica*
Rhamnaceae	*Ceanothus, Colletia, Discaria, Kentrothamnus, Retanilla, Trevoa*
Rosaceae	*Cercocarpus, Chamaebatia, Cowania, Dryas, Purshia*

Una minuciosa descripción sobre el origen en el tiempo geológico de estos vegetales nodulados los ubica en el período cuaternario. Actualmente ocurren en áreas templadas y algunas en la zona circumpolar. Las que se encuentran en zonas tropicales, lo hacen sólo a altas latitudes, como *Coriaria*, en N. Guinea y Perú, *Cercocarpus*, en Méjico y *Alnus,* en Perú. La excepción la constituye *Casuarina*, que se extiende en zonas costeras tropicales del Océano Pacífico y del Indico. Esta distribución contrasta con la de las leguminosas (tropical y templada cálida).

El conocimiento de especies actinorríticas se incrementará seguramente en los próximos años, con la contribución de botánicos, fisiólogos vegetales, ingenieros forestales. Se observa un rápido desarrollo de los estudios sobre estas asociaciones dado su contribución a la economía del nitrógeno en dunas y suelos muy pobres.

El proceso es muy parecido al que ocurre en leguminosas: los pelos radicales en contacto con el endofito se encurvan y las hifas penetran avanzando hacia células corticales que son estimuladas a dividirse (figura 13). Las hifas penetran en las células en división, se ramifican y forman las clásicas vesículas en la periferia de estos conglomerados. La infección progresa y se forma el llamado **nódulo primario**, que se reconoce como una deformación de una raíz lateral cuyo crecimiento se detiene. El nódulo verdadero se completa por surgimiento de raíces laterales inducidas cerca de los nódulos primarios, que se transforman en **lóbulos nodulares** por infección persistente de su región cortical. En los **nódulos verdaderos**, la penetración de las células jóvenes de la corteza y la diferenciación del endofito es esencialmente la misma que en los nódulos primarios.

En *Casuarina y Myrica,* el ápice de cada lóbulo nodular da lugar a una raíz pero con geotropismo negativo (figuras 11 y 12), debido a bajos niveles de ácido indolacético, lo que le da a los nódulos una apariencia muy particular. En el campo, los nódulos pueden alcanzar diámetros de más de 8 cm y muchas veces resulta difícil obtenerlos, pues se distribuyen a lo largo de un sistema radical muy extenso, que en suelos pedregosos y compactados puede llegar a varios metros.

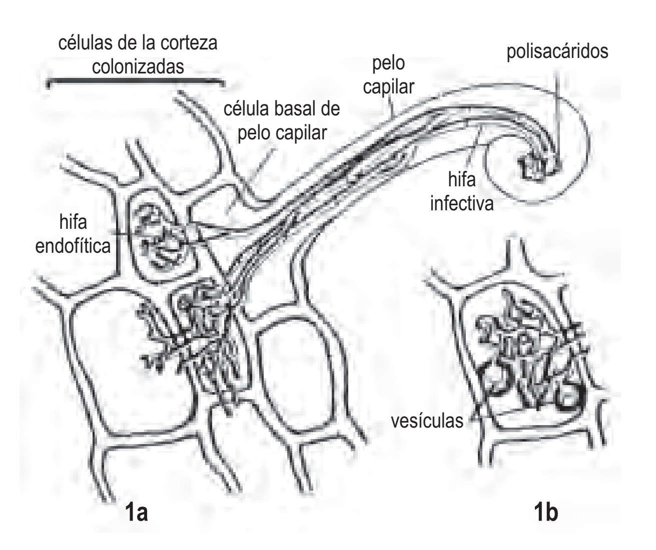


Figura 13- Nodulación en actinorrizas. 1a) células de la corteza radical, 1b) células con *Frankia*

La existencia de poblaciones extranodulares del endofito es esencial para lograr colonizar plántulas y la diseminación en el campo. La presencia de cepas de *Frankia* en el suelo está asegurada, como en el caso de las leguminosas, por el decaimiento y desintegración de los nódulos al finalizar la actividad simbiótica.

La región apical (2-3 mm) de los lóbulos del nódulo parecen constituir las partes más activas en la fijación del nitrógeno. Allí precisamente, los racimos de vesículas presentan la mayor actividad y reducen activamente las sales de tetrazolium. El aislamiento de las vesículas y la incorporación de ATP y ditionito permitió comprobar que son el sitio de la fijación. Incluso los resultados de fijación se expresan por número de vesículas.

Usos: el empleo que se les da a estas plantas es variable:

- muchas especies de *Alnus* pueden alcanzar 30-35 m en 50 años con diámetros de 0,6 m y se emplean en **muebles, postes, enchapados**, y en la preparación de pulpas para la elaboración de tejidos

- *Casuarina* se emplea también para **postes** y es rica en energía y se usa como **leña**. Pueden alcanzar 4 a 5 m en 2 años

- como **alimento** se usan poco: *Hippophae* da frutas ricas en vitamina C y en aceite y suele complementar la dieta humana

- *Ceanothus y Purshia*, como **forraje** en la alimentación de ciervos

- otras especies poseen **uso medicinal**, como astringentes, febrífugos, estimulantes o hipnóticos: *Myrica, Colletia*

- pero el empleo más promisorio es sin duda el de la **recuperación de suelos erosionados, la fijación de dunas y su inclusión en sistemas silvopastoriles** ya que brindan abrigo y sombra a los animales, además de brindar N fijado a la pastura asociada

El empleo del N^{15} demostró la importancia ecológica de estas asociaciones, acelerando sucesiones vegetales en

suelos pobres. Estos árboles son empleados en silvicultura, en planes de forestación, en sistemas agroforestales, contribuyendo a incrementar el nivel de nitrógeno de los mismos.

El cuadro 15 muestra el contenido de nitrógeno en hojas de algunas de estas plantas. Los datos de N en los rastrojos no deben tomarse como todo el nitrógeno fijado, ya que, dependiendo del nivel de N del suelo, una parte es reciclada a partir del mismo.

Cuadro 15 - N% en hojas y en mantillo de plantas actinorrítcas noduladas

Especies	N% en hojas	Mantillo ton/ha/año	N%	Edad años	N total kgN/ha/año
Alnus incana	2,82	-	-	-	-
A. crispa	1,5	3,0	5	157	
A. rubra	1,3	2,0	0-40	30	
	2,17	9,3	1,82	12	169
A. glutinosa	2,57	-	-	-	-
Casuarina littoralis		2,9	1,0	-	290
C. equisetifolia	1,30	-	-	-	-
Ceanothus velutinus		6,2	1,46	9	91
Eleagnus orientalis		13,5	1,35	-	183

Numerosos son los trabajos realizados en los últimos años sobre esta simbiosis que permiten ampliar la capacidad de incorporación de N en arbustos y árboles de importancia silvopastoril.

El actinomicete se propaga en el suelo. La sobrevivencia e infectividad ha sido demostrada cuando se emplean homogeneizados nodulares como material infectivo. La infectividad, que disminuye con la dilución, puede mantenerse a bajas temperaturas -en heladera- por varios meses. Se pueden conservar nódulos secos al aire sobre sílico-gel a 6ºC. El congelamiento permite también mantener los inóculos viables. Se observó que la presencia de nódulos con esporas permite mayor sobrevivencia, siendo las esporas más resistentes a condiciones adversas del suelo. Las partículas del endofito responsables de la propagación y de la colonización posterior parecen ser hifas finas, más que las esporas.

Numerosos estudios se han realizado a los efectos de lograr buena sobrevivencia de este organismo en inoculantes comerciales a emplear en los viveros. Los ensayos incluyen soportes inertes como la vermiculita. *Frankia* resultó muy resistente al ser atrapada en bolitas de alginato, las que desecadas se conservan por largos períodos de tiempo (Frioni *et al.*, 1994)(Anexo práctico).

Muchas experiencias se realizaron para determinar la distribución de los endofitos y de sus respectivas plantas hospedantes. Se encontraron:

- poblaciones locales de *Frankia* en ambientes sin los hospedantes, que pueden haber migrado por agua, viento, lluvia

- las poblaciones del endofito siguen, en general, a las poblaciones de la planta hospedante. En *Alnus*, cuya nodulación es muy extendida, el endofito se encuentra en un 100% de las zonas de distribución de la planta.

Los nódulos de estas plantas fijan nitrógeno, como lo hacen otros sistemas fijadores, dependiendo su actividad de la biomasa del tejido nodular, de la actividad de la nitrogenasa y del período en que permanecen activos. La respiración y la actividad nitrogenasa de los nódulos declina con los incrementos de la edad de los nódulos, como ocurre en general en nódulos perennes. De modo que, en promedio, estos nódulos fijan menos que nódulos jóvenes de leguminosas anuales.

El cuadro 16 (Gauthier *et al*., 1984) muestra la actividad nitrogenasa de *Colletia spinosissima,* su contenido de N%, el N total por planta y su peso seco en ensayo control e inoculado en cultivo hidropónico.

Cuadro 16 - Efecto de la inoculación con *Frankia* en *Colletia spinosissima*

Tratamiento	Peso seco mg/planta	ARA N%	N total	mMC_2H_4/ h/planta
Control	56	0,8	0,45	0
Inoculado	113	1,5	1,69	0,68

Se han señalado valores de fijación de 200-250 kgN/ha/año en *Alnus*, entre 60 y 230 en *Casuarina*, 20-180 en *Hippophäe*, de 150 en *Coriaria*. En general, en la mayor parte de los ecosistemas con especies leñosas fijadoras de N_2, se señalan ganancias de N a nivel del suelo iguales o superiores a 100 kgN/ha/año, del mismo orden de magnitud que las aportadas como fertilizantes en coníferas (Subba-Rao y Rodríguez-Barrueco, 1992). La selección de especies eficientes es una alternativa a la fertilización, logrando ganancias sensibles de la productividad, sin aumento de los costos.

Factores que afectan a la fijación del nitrógeno

Tanto la nodulación como la fijación del nitrógeno están afectadas por los mismos factores que en otras simbiosis fijadoras de N_2: fotosíntesis, factores ambientales, como la temperatura, el aporte de nutrientes, incluido el nitrógeno combinado, la aireación. La cantidad fijada varía mucho entre especies e incluso por la posición de los nódulos en la raíz.

- **El número de partículas** infectivas en la rizosfera afecta directamente a la nodulación y por lo tanto a la fijación del N_2. La inoculación tendrá efectos positivos cuando ese número es bajo

- **El nitrógeno combinado** afecta negativamente a la fijación por estos organismos, al igual que el proceso en leguminosas. Se observaron, sin embargo, diferencias entre la sensibilidad de especies vegetales frente al nitrógeno combinado; *Alnus* es bastante insensible y se los puede encontrar nodulados en suelos relativamente ricos en nitrógeno

- **La temperatura del suelo**: afecta marcadamente a la fijación, aunque la tolerancia a temperaturas extremas varía con las especies. El óptimo para muchas plantas se ubica entre 20-25 ºC, sin embargo especies de *Casuarina* y *H. rhamnoides* toleran altas temperaturas, lo que les brinda gran ventaja ecológica. Las bajas temperaturas afectan también negativamente al proceso

- **La acidez**: se piensa en general que las no-leguminosas son más tolerantes a los bajos pH que las leguminosas. *Alnus glutinosa y Myrica gale* se mostraron muy resistentes a las bajas concentraciones de iones hidrógeno

- **La humedad**, muchas especies actinorríticas que crecen en áreas secas son afectadas por una sequía transitoria y la actividad nitrogenasa cesa en plantas sometidas a una succión de -25 barias en el xilema. En general ocurre un decaimiento masivo de nódulos en el verano. La inundación, al limitar la difusión de los gases, limita la actividad de los nódulos. Algunas especies poseen estructuras en las extremidades de los nódulos llamadas **lenticelas**, que facilitan la difusión del O_2 a través del tejido nodular

- **Los cambios diurnos y estacionales:** en árboles perennes, la actividad nitrogenasa se induce temprano en la primavera, cuando comienza la emergencia de las hojas. Luego se incrementa a medida que lo hace la temperatura. Las determinaciones de la fijación del N_2 se han realizado sobre todo a nivel de laboratorio, con nódulos aislados y son pocos los datos de campo que permiten conocer el aporte de nitrógeno al suelo

Transporte de los productos de la fijación hacia la planta

Como en otras simbiosis, un 90-95% de los compuestos nitrogenados de la fijación son transferidos al hospedante. Luego de unos minutos de exposición a una mezcla de gases con N^{15}, un 25% del nitrógeno fijado se detecta en las partes basales de los nódulos de *Alnus,* el resto se encuentra en las partes superiores de los lóbulos nodulares y luego de una hora de inoculación, en las raíces vecinas al nódulo.

Los compuestos transferidos son sobre todo **aminoácidos:** arginina, glutamina; la citrulina es más común en nódulos de *Alnus glutinosa*. No se sabe si su síntesis es realizada por la planta, el endofito o por ambos. Entre las enzimas para la asimilación del amonio, se encontró la glutamato deshidrogenasa (**GDH**) y la glutamino sintetasa (**GS**), presentes en nódulos de *A. glutinosa*, sobre todo en el citoplasma del hospedante y no tanto en los residuos de 20 micras con vesículas. Se postula que la asimi-

lación la efectúa el hospedante, mientras que el endofito excretaría el amonio producido en la reducción del N_2, al igual que en las otras simbiosis fijadoras de nitrógeno.

El H_2 es liberado escasamente por la presencia de una **hidrogenasa** muy eficiente contenida en las vesículas que asegura el reciclamiento de los electrones hacia la nitrogenasa.

Como se observa, los sistemas simbióticos fijadores de N_2 presentan gran similitud en cuanto a los sistemas enzimáticos: nitrogenasa e hidrogenasa, en las enzimas para la asimilación del amonio y en los efectos del medio sobre la magnitud del proceso.

Perspectivas

El empleo de las plantas actinorríticas como pioneras en suelos pobres o degradados es ya práctica común en muchos países. Algunas especies se pastorean, como jóvenes ejemplares de *Alnus* spp. Representan una buena alternativa frente a las leguminosas en ciertas zonas. Progresan los estudios sobre las relaciones de especificidad endofito-hospedante, los mecanismos de reconocimiento y los procesos de colonización. Constituye un área cuyos estudios se incrementan rápidamente por la importancia del nitrógeno como elemento limitante del desarrollo vegetal y la capacidad de estas plantas de colonizar áreas muy erosionadas, suelos muy pobres en todas las regiones climáticas.

Resumen

El cuadro 17 compara las simbiosis por rhizobio y por *Frankia* y la figura 14 esquematiza ambos tipos de nódulos. Se aprecia la colonización central en las leguminosas y periférica en no-leguminosas.

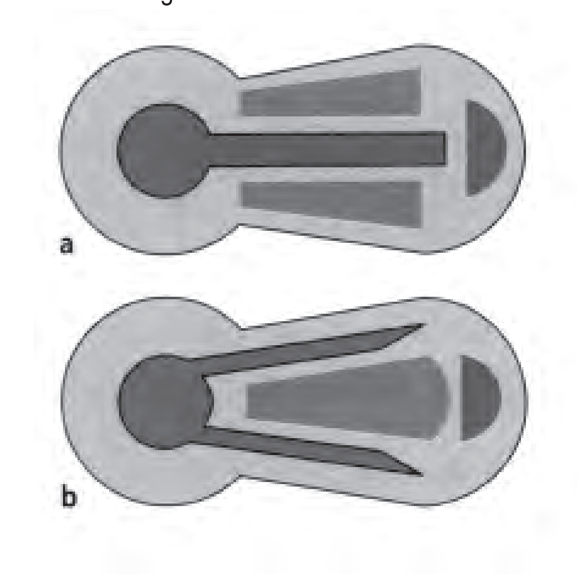


Figura 14- Esquema de nódulos en: a) actinorrizas b) leguminosas

Cuadro 17- Comparación de las simbiosis en leguminosas y en plantas actinorrizas

	Leguminosas	**Actinorrizas**
Morfología nódulo	Simple	Complejo
Velocidad de crecimiento de la bacteria	Lentas: más 6h(tg) Rápidas: menos 6h	Más 15 horas (tg)
Sistema vascular en nódulos	Periférico	Central
Hidrogenasa (Hup^+)	No general	General
Fijación de N_2 *in vitro*	Excepcional	General
Protección O_2: hemoglobina	Siempre presente	Variable, algunas excepciones
Nodulación aérea	Varias especies	Excepcional
Transporte N fijado como ureídos	Puede emplearse en plantas (tropicales)	No lo forman
Nodulación perenne	Excepcional	Es la regla

Bibliografía

Barea, J. M., Cuantificación de la fijación biológica de N mediante el uso de N^{15}. En: **Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes, vol II,** 1991, Olivares, J. y J. M. Barea (coord), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Colección Nuevas tendencias, Madrid: 105-127

Bottini, R., Fulchieri, M. Pearce, D. y Pharis, R. P. Identification of giberelins A1, A3 and iso-A3 in cultures de *Azospirillum lipoferum*. 1989, Plant Physiol. 90:45-47

Döbereiner, J., y F.P. Pedrosa; **Nitrogen-fixing Bacteria in Non-Legumineus Crop Plants**. 1987, Springer-Verlag, Berlín

Döbereiner, J., V.M. Reis, M. A. Paula y F. Olivares, Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. En: **New Horizons in Nitrogen Fixation,** 1992 R. Palacios, J. Mora y W. E. Newton, (eds) Kluver Academic Publishers, Dordrecht: 671-676

Dommergues, Y. Nitrogen fixation by trees in relation to soil nitrogen economy. 1995, Fertilizer Research 42: 215-230

Dommergues, Y., Duhoux, E. y Diem, H. G. **Les arbres fixateurs d´azote.** 1999, Co-edición CIRAD/FAO/IRD Espaces 34, París

Duhoux, E. y Nicole, M. **Biologie Végétale: Associations et interactions chez les plantes**. 2004, Dunod, París

Franche, C., Laplaze, L., Duhoux, E., Bogusz, D. Actinorhizal symbioses: recent advances inplant molecular and genetic transformation studies, 1998. Critic Rev. Plant Sci, 17:1-28

Frioni, L., Le Roux, C., Dommergues, Y. y Diem, H. G. Inoculant made of encapsulated *Frankia*: assessment of *Frankia* growth within alginate beads. 1994 World J. Microbiol. & Biotech 10: 118-121

Frioni, L., R. Dodera, D. Malates e I. Irigoyen An assessment of nitrogen fixation capability of leguminous trees in Uruguay. 1998, Applied Soil Ecology 7: 271-279

Frioni, L., D. Malates, I. Irigoyen y R. Dodera Promiscuity for nodulation and effectivity in the N_2-fixing legume tree *Acacia caven* in Uruguay, 1998, Applied Soil Ecology 7: 239-244

Fulchieri, M. y L. Frioni, *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*). Effect on yield in a field experiment in Central Argentina, 1994, Soil Biol. Biochem 26(7): 921-923

Gauthier, D.; Frioni, L.; Diem, H. G. y Y. Dommergues, The *Colletia spinosissima-Frankia* Symbiosis, 1984, Oecol. Plantarum, 5 (19); Nº 3: 231-239

Gonzalez-Lopez, J. Microorganismos diazotrofos asociados a raíces de plantas no-leguminosas. En : **Interacción Planta-Microorganismo, Biologia del nitrógeno,** 1992, González López, J. y Lluch Plá, C. (coord),. Editorial Rueda, Madrid: 71-96

Izaguirre, P. y R. Beyhaut. **Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas.** 1998. Parte 1: *Papilionoideae*: Ed. Hemisferio Sur. Montevideo, 549 pp.

Izaguirre, P. y R. Beyhaut. **Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas.** 2003. Parte 2: *Caesalpinioideae*. Parte 3: *Mimosoideae*: Ed. Hemisferio Sur. Montevideo, 302 pp.

Graham, P. H. Biological Dinitrogen Fixation:Symbiotic. En: **Principles and Applications of Soil Microbiology**. 1998, Sylvia, Fuhrmann, Hartel y Zuberer (eds), Prentice Hall, New York

Kondorosi, A. Overview on genetic of nodule induction: Factors controlling nodule induction by *Rhizobium meliloti*. En: **Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions.** 1991, H.Nennecke y D.P.S. Verma (eds), Kluver Academic Publishers, Dordcrecht, Holanda: 111-118

Martinez, E., D. Romero y J. Caballero-Mellado, *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. 1996, Crit. Rev. Plant Sci. 15(2):113-140

Okon, Y (ed) ***Azospirillum*-Plant Associations**. 1994, CRC Press, Boca Raton, Fl

Okon, Y. y C.A. Labandera-Gonzalez, Agronomic applications of *Azospirillum* of 20 years worldwide field inoculation, 1994, Soil Biol. Biochem.26(12): 1591-1601

Selosse, M. A., Les cyanobactéries, d'étonnants procaryotes autotrophes. 1996. Biologie - Géologie 3: 481-529.

Sprent, J.I. y P. Sprent. **Nitrogen Fixing Organisms-Pure and Applied Aspects**, 1990. Chapman y Hall, London 256 pp

Subba Rao, N. S. y C. Rodriguez-Barrueco **Symbiosis in Nitrogen-Fixing Trees**, 1993, Subba Rao y R.Barrueco (eds) Oxford & IBH Publishing Co. New Delhi

Truchet, G., Camut, S., de Billy, F., Odorico, R.,Vasse, J. The *rhizobium* - legume symbiosis 1989. Protoplasma, 149: 82-88.

Urquiaga, S. y J. Döbereiner Fijación biológica de nitrógeno asociada con gramíneas forrajeras, cereales y caña de azúcar. En : **Fijación y Movilización de Nutrientes, vol II,** 1991, Olivares, J. y J. M. Barea (coord), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, colección Nuevas Tendencias, vol 18, Madrid: 71-89

Vincent, J. M. **Nitrogen Fixation in Legumes,** 1982, Academic Press, Londres

Wood, S. M., Newcomb, W., Nodule morphogenesis: the early infection of alfalfa (*Medicago sativa*) root hairs by *Rhizobium meliloti*. 1989. Can. J. Bot., 67: 3108-3122.

Preguntas de repaso

1) Explique por qué la fijación biológica de N_2 es más eficiente en asociaciones simbióticas nodulares.
2) ¿Cómo demostraría la respuesta anterior?
3) Señale relaciones de diazotrofos heterótrofos con el O_2 y explique en qué condiciones fijan N_2.
4) ¿Qué mecanismos de protección de la N_2asa puede señalar?
5) ¿Cuál o cuales de ellos presenta: *Azotobacter, Azospirillum, Clostridium, Klebsiella, Bacillus*?
6) Explique una asociación de una cianobacteria fijadora de N_2 con vegetales y su aplicación agronómica
7) ¿A qué se llama azollización?
8) ¿Qué importancia práctica pueden tener las bacterias fotosintéticas anaerobias? Y ¿que rol cumplieron en estudios bioquímicos y metabólicos?
9) Señale 3 asociaciones simbióticas fijadoras de N_2:
10) Características de rhizobio:
11) Aislamiento a partir de suelo sin cultivo de leguminosas
12) Señales moleculares en la iniciación de la nodulación:
13) Diferencias entre nódulos de rhizobio y de *frankia*
14) ¿Por qué *Frankia* puede fijar al aire?
15) ¿Qué se entiende por inoculación?
16) ¿En qué situaciones aconsejaría inocular una leguminosa?
17) ¿Cómo evaluaría el efecto de un inoculante?
18) Principales cultivos inoculados con diazotrofos que conozca
19) Si debe inocular y no dispone de cepas eficientes, ¿qué procedimiento seguiría?
20) ¿Qué ensayos efectuaría en la evaluación de un inoculante comercial?

16 Las micorrizas

Existen numerosas relaciones mutualísticas entre hongos y raíces de plantas vasculares y no vasculares. Una de las más extendidas la constituyen las asociaciones micorrícicas, que involucran varios tipos de hongos del suelo y raíces.

El término **micorriza (***mukés*=hongo, *rhiza*=raíz) fue propuesto por Frank, en 1885 para describir estos órganos mixtos formados por raíces y hongos del suelo, que no provocan síntomas de enfermedad y se las considera como verdaderas simbiosis. en contraste con la infección de raíces con hongos patógenos. Los hongos colonizan el tejido cortical de las raíces durante el período de activo crecimiento vegetal.

La asociación está caracterizada por:

- el movimiento de productos carbonados de la planta al hongo
- mayor absorción de agua y nutrientes por parte del hongo que favorece a la planta

Están muy distribuidas en el reino vegetal y sólo algunas especies acuáticas, las crucíferas y otras pocas especies, no forman normalmente micorrizas. Se reconocen en los fósiles vegetales más antiguos y se postula que la evolución de plantas terrestres desde hábitats semi acuáticos fue posible gracias a relaciones mutualísticas con algas y hongos. Aproximadamente el 95% de las especies de plantas vasculares pertenecen a familias característicamente micorrizadas, así como numerosas Briofitas y Pteridofitas.

La micorrización ha evolucionado como la norma en la nutrición terrestre y no como la excepción.

El cuadro 1 muestra los beneficios que se reconocen en la nutrición vegetal por la micorrización. La importancia de estas asociaciones se demostró por los fracasos en la implantación de especies exóticas, al cambiarlos de hábitat o por la dificultad en la forestación de zonas erosionadas.

Cuando se agregan cultivos adecuados de hongos micorrícicos, o mantillo de la zona de origen, la sobrevivencia y desarrollo de especies forestales aumentan en forma sorprendente. En base a los caracteres morfológicos se reconocen varios tipos de micorrizas.

Cuadro 1- Beneficios de la micorrización en vegetales

- ➢ mejoramiento en la absorción de nutrientes
- ➢ incremento en la tolerancia a:
  - sequía
  - sales
  - metales pesados
  - patógenos
- ➢ estabilización del suelo

Las características de los dos tipos más importantes: **endomicorrizas arbusculares** (MA), llamadas también vesículo-arbusculares, V-A y las **ectomicorrizas** (EM) se señalan en el cuadro 2 y en la figura 1 (Duhoux y Nicole, 2004).

En las **ectomicorrizas**, la raíz está completamente rodeada por un manto fúngico, bien desarrollado, cuyas hi-

fas se expanden entre las células corticales de la raíz (red de Hartig). Son comunes entre Gimnospermas (especialmente *Pinaceas*) y Angiospermas (especialmente *Salicaceae, Betulacceae, Fagaceae, Ulmaceae, Rosaceae, Leguminoseae, Myrtaceae, Tiliaceae, Ericaceae*). La mayoría son árboles.

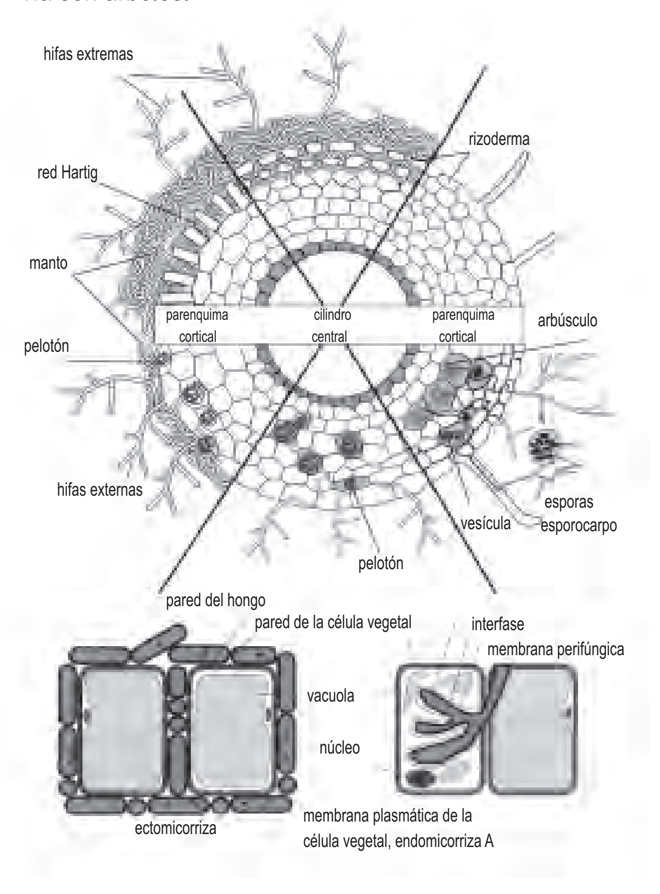


Figura 1- Esquema de raíz: normal, con pelos capilares, micorrizada por ecto, endo y ectendomicorrizas

Algunas especies hospedantes pueden formar también los otros dos tipos de micorrizas: **ectendomicorrizas y endomicorrizas**, en donde la característica es la penetración de las células de la raíz.

En las **endomicorrizas** se encuentran hifas intercelulares e hifas que penetran en las células del hospedero y se aprecian: **hifas, vesículas, arbúsculos o haustorios y esporas.** Muchas veces no se aprecian modificaciones externas que evidencien la colonización. Se describen también las **ectendomicorrizas**, que son formas intermediarias entre los dos grupos precedentes y que se aprecian frecuentemente en los viveros forestales.

Las micorrizas tipo **arbutoide,** son ectendomicorrizas cuyas hifas en forma de pelotones intracelulares están muy desarrolladas. Otros tipos han sido descriptos (endomicorrizas con pelotones) en las *Orchidaceae,* las *Monotropeae* y en las *Erycaceae*.

Los estudios relacionados con la naturaleza del hongo, la fisiología de la micorriza, el aislamiento y propagación del endosimbionte y las prácticas de inoculación, se han incrementado en los últimos años (Agerer, 1994, Allen, 1991, Norris *et al*, 1994, Siquiera *et al*, 1994).

Cuadro 2 - Características de los tipos más importantes de micorrizas

Características	Arbusculares	Ectomicorrizas
hongo		
hifas septadas	-	+
hifas no septadas	+	-
intracelulares	+	-
manto fúngico	-	+
red de Hartig	-	+
vesículas	+ o -	-
arbúsculos	+	-
taxonomía	*Zygomycetes= Glomeromycetes*	*Basidiomycetes, Ascomycetes Zygomycetes*
planta	Bryophytas, Pteridophytas	Pocas Pteridophytas
taxonomía	Gymnospermas	Gimnospermas
	Angiospermas	Angiospermas

Ectomicorrizas

La simbiosis ectomicorrítica (figura 2)(Dommergues, Mangenot, 1970) ocurre sobretodo en plantas leñosas, árboles o arbustos y solamente en un 3%-5% del total de especies vegetales, pero la gran distribución geográfica y la importancia económica de esas especies contribuyó al desarrollo de los estudios en esta asociación.

Características: se aprecia un manto fúngico alrededor de las raíces (figura 2), hifas intercelulares, formando la típica red de Hartig entre las primeras células corticales y

un conjunto de filamentos miceliares que exploran el suelo para asegurar la nutrición mineral de la asociación, relacionados a las fructificaciones fúngicas o carpóforos.

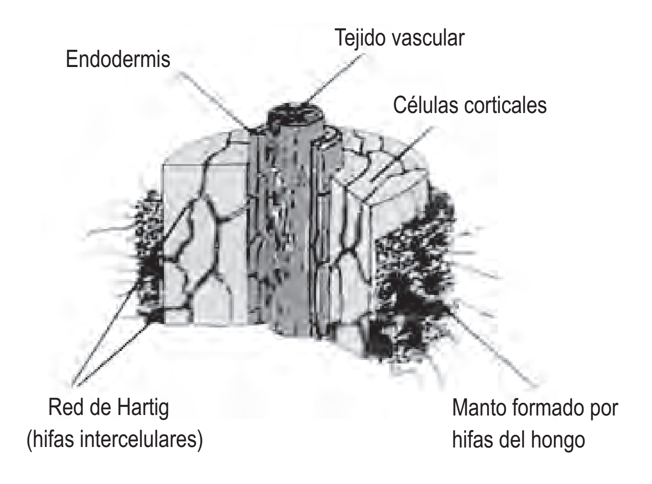


Figura 2- Esquema de una raíz ectomicorrizada

El manto fúngico puede representar en 40% del peso total del órgano (figura 3). Las hifas se pueden extender al suelo vecino y también penetrar espacios intercelulares de la corteza. Las células corticales se alargan transversalmente y los pelos capilares están ausentes. Los tejidos meristemáticos y los del ápice están reducidos en relación a raíces no micorrizadas. Las raíces colonizadas son por lo general laterales, al emerger de la corteza de raíces micorrizadas. Estas raíces son de corta longitud, muy ramificadas y son reemplazadas periódicamente.

La morfología y anatomía de las ectomicorrizas son variadas según el estado de desarrollo, el hongo asociado y la presencia de más de una especie fúngica (figuras 4 y 5). Caracteres anatómicos, fisiológicos, ecológicos y taxonómicos se tienen en cuenta en la descripción de las ectomicorrizas, como la morfología de las hifas, estructura y aspecto del manto fúngico, presencia de rizomorfos, color, flourescencia, olor, hábitat (Alvarez, 1991).

Las ectomicorrizas de árboles forestales pueden ser pardas, negras, rojas, amarillas, blancas. Muchos hongos inducen ramificaciones dicotómicas en las raíces, las que le dan forma coraloide característica; otras pueden tener formas ramificadas, pinadas, globulosas, etc. (figura 4). El hongo se mantiene en la corteza pudiendo llegar a la endodermis, vía lámina media, por acción de enzimas pectinolíticas, dependiendo de la agresividad del hongo y la respuesta del hospedante

Las plantas hospederas

De gran distribución en las Gymnospermas: *Pinaceae* (pinos, abetos, epigeas) y las Angiospermas, sobre todo dicotiledóneas como *Fagaceae* (hayas, robles, castaños), *Myrtaceae* (eucalipto) y familias de plantas tropicales *(Caesalpinoideae*). Es de hacer notar que una misma especie puede presentar simbiosis ecto y endomicorrítica, como es el caso de los álamos, eucaliptos, casuarinas y leguminosas arbóreas, que pueden presentar tres tipos de simbiosis a lo largo de su ciclo de vida: nódulos con rhizobio, ecto y endomicorrizas (se habla de simbiosis triple).

Los hongos

Contrariamente a lo observado con los hongos que forman endomicorrizas, son numerosos las especies ectomicorríticas, con más de 5.000 especies. Pertenecen a las subdivisiones *Ascomycotina* y *Basidiomycotina*, cuyos ciclos sexuados son bien conocidos. Muchos presentan órganos de reproducción sexual o carpóforos comestibles (boletos, agaricales, trufas), mientras que otros son tóxicos (*Amanita phalloïdes*). Algunos hongos presentan un espectro de especificidad estrecho, como *Boletus betulicola*, y otros como *Pisolithus tinctorius*, coloniza más de una decena de especies vegetales.

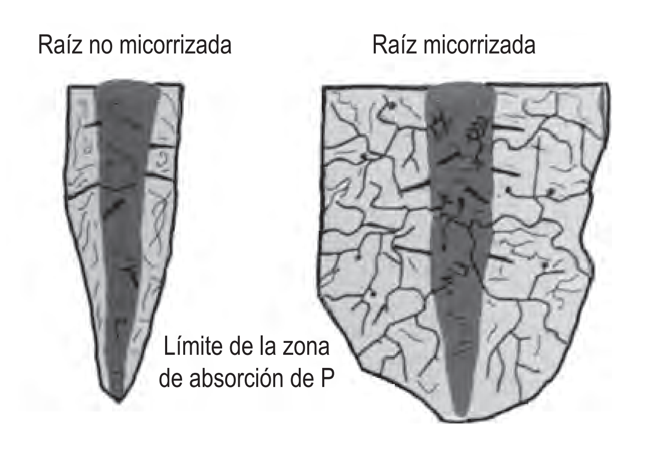


Figura 3- Zonas de absorción de nutrientes en raíz no micorrizada (izquierda) y micorrizada (derecha)

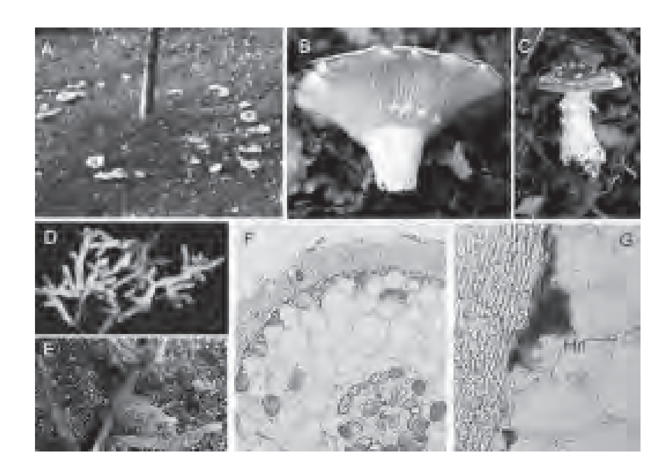


Figura 4- Carpóforos de hongos ectomicorrícicos (A, B, C), raíces micorrizadas (D, E) y cortes de raíces microrrizadas (F,G) se aprecia el manto fúngico (s) y la red de Hartig (Hn) en las primeras filas de células corticales

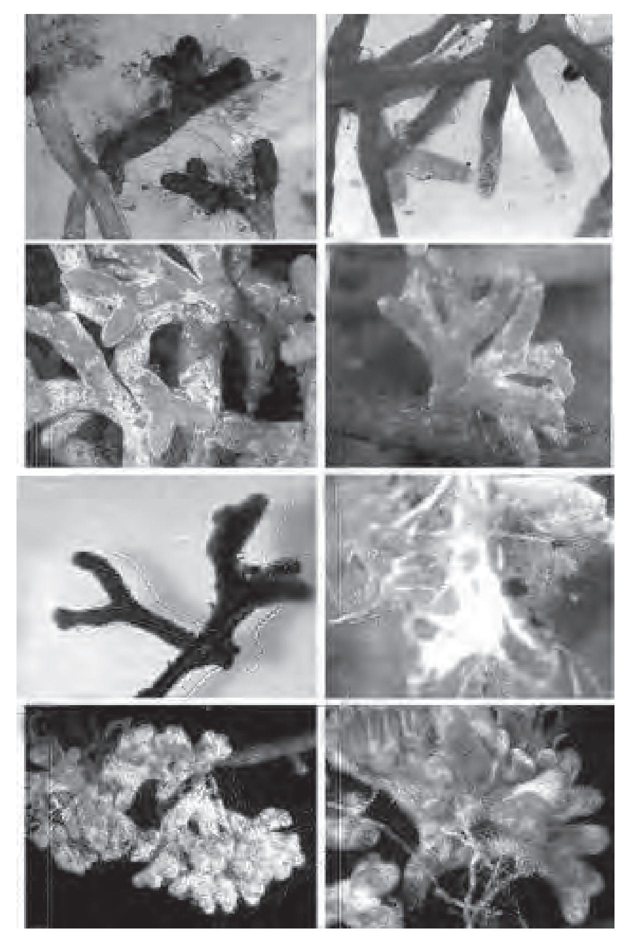


Figura 5- Tipos morfológicos de ectomicorrizas Observese estructura dicotómica, hifas a partir del manto fúngico y las formas coraloides.

La identificación de los hongos se realiza a partir de sus fructificaciones y de observaciones citológicas de hifas (doliporos en *Basidiomycotina* y cuerpos de Woronin en *Ascomycotina*) ayudado con marcadores moleculares (secuencias del ARN ribosomal).

Por otra parte, estos hongos son fáciles de aislar y de cultivar al estado puro (Honrubia *et al.*, 1994, Malvarez *et al.,* 1997; Anexo práctico).

La mayoría son: *Basidiomycetes: Hymenomycetes,* como *Boletus, Cortinarius, Suillus, Amanita, Thricholoma, Laccaria* y entre los *Gasteromycetes* se encuentran especies de *Rhizopogon, Pisolithus y Scleorderma*. Algunos de estos géneros poseen especies saprofitas o parásitas que no forman simbiosis con raíces y es posible que los ectomicorrícicos hayan evolucionado a partir de éstos (figura 6).

De acuerdo a su capacidad para vivir libremente y su grado de especificidad con el hospedante, los hongos ectomicorrícicos se dividen en:

- **saprofitas,** que pueden formar micorrizas con hospedantes adecuados

- **normalmente micorrícicos**, con amplio rango de hospedantes, y con capacidad saprofítica. La mayoría de los hongos que forman EM poseen escasa o nula habilidad para vivir libremente, pero poseen amplio rango de hospedantes.

- **con escasa capacidad saprofita**, con estrecho rango de hospedantes: *Suillus plorans o Boletinus asiaticus,* que pueden encontrarse en una sola o dos especies.

La mayoría de los conocimientos sobre la fisiología de las ectomicorrizas se obtuvo con los dos últimos grupos. Las diferencias en los grados de colonización dependen, entre otras causas, de la actividad de enzimas como **celulasa y polifenol oxidasa**.

Fuentes de carbono: muchas especies ectomicorrícicas obligadas han podido desarrollarse en cultivo puro, con nutrientes relativamente simples, como glucosa y otros azúcares. Muchas no pueden emplear disacáridos y otras especies pueden degradar polisacáridos siem-

pre que se agregue algo de glucosa (inducción enzimática). Se han detectado actividades de celulasas, hemicelulasas y amilasas pero, como grupo, estos hongos son en general incapaces de descomponer mantillos u otras formas de materia orgánica del suelo, y dependen del hospedante para la provisión de compuestos carbonados simples.

Fuentes de nitrógeno: son variadas, en general sales de amonio, aminoácidos y otras formas de N-orgánico son rápidamente utilizadas (experiencias con N^{15}), los nitratos son menos empleados. Altos niveles de N en el suelo inhiben la síntesis de ectomicorrizas: una C/N alta parece ser prerrequisito para su formación.

Factores de crecimiento: muchos de estos hongos requieren ciertas vitaminas del complejo B, como tiamina y biotina; otras especies prefieren inositol, ácido nicotínico y ácido pantoténico.

Los hongos ectomicorrícicos producen **auxinas, giberelinas, citoquininas** y una variedad de vitaminas, antibióticos, ácidos grasos. Las sustancias de naturaleza auxínica reproducen caracteres de la micorrización al incorporarlas a raíces creciendo asépticamente: se forman raíces cortas y gruesas con ausencia de pelos y elongación radial de células con corticales. La microflora rizosférica puede brindar el triptofano para la síntesis del **AIA** (ácido indol acético), que induce estos cambios.

Si las raíces micorrizadas pierden al hongo asociado, las características estructurales desaparecen y se transforman en raíces normales. El exceso de nitrógeno afecta a la micorrización: puede provocar que las auxinas se conviertan en compuestos relacionados, pero sin actividad promotora del crecimiento, e incluso inhibir su síntesis por el hongo.

Los factores físicos también afectan el desarrollo de estos hongos. El óptimo del crecimiento se sitúa entre 18 y 27ºC, para muchos cesa sobre 35ºC y debajo de 5ºC. Se consideran acidófilos, con pH óptimo entre 4 y 6, algunos crecen bien a pH 3,0. Son aerobios, por esto los cultivos para preparar inoculantes se agitan, y sensibles a la falta de agua.



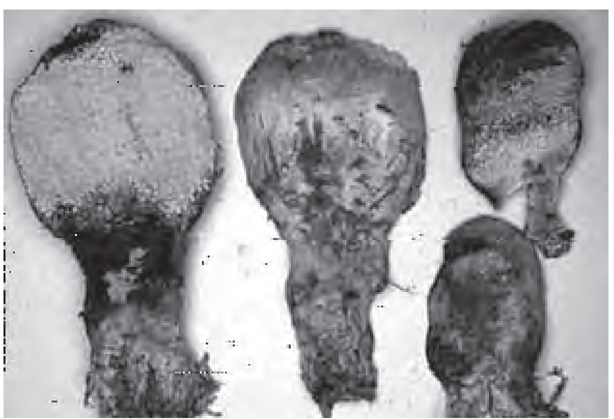




Figura 6- Fructificaciones de hongos ectomicorrícicos: *Laccaria, Pisolithus y Scleroderma*

Interacciones entre el hongo y el hospedante

Si bien el desarrollo de plántulas de árboles no depende siempre de la simbiosis, tanto el crecimiento como el nivel de minerales son incrementados.

- **La planta** logra mayor absorción de nutrientes al aumentar la superficie radical, incrementan la resistencia a

patógenos, a toxinas, pH, temperatura y humedades adversas. La suberización de las raíces está limitada y se alarga su vida útil

- **El hongo**, por su parte, obtiene los nutrientes carbonados simples que requiere en las etapas iniciales y un ambiente que lo protege de la intensa competencia microbiana

Fisiológicamente, las asociaciones micorrícicas constituyen uno de los mejores ejemplos de parasitismo controlado. Los intercambios entre ambos componentes de esta asociación se estudian con elementos marcados:

- $^{14}CO_2$ en las plantas para seguir los compuestos orgánicos radioactivos en el manto fúngico y en las hifas

- ^{32}P en compuestos orgánicos o minerales insolubles en el suelo, que es transferido hacia la planta, por las hifas del hongo. Las plantas micorrizadas se desarrollan mejor en suelos deficientes en nutrientes como N, P, K.

Las raíces micorrizadas carecen de **pelos capilares**, la mayoría de los nutrientes deben ser absorbidos por las capas externas de la vaina fúngica y son trasladados a la corteza radical, por las hifas. La gran superficie de contacto entre el hongo y la planta permite un rápido intercambio de nutrientes.

La absorción de fosfatos es entre 2 y 5 veces superior en raíces micorrizadas, en relación a controles no infectados. Los sitios más activos de absorción corresponderían a lugares de emergencia de raíces cortas e infectadas. Los fosfatos se desplazarían por los espacios entre las hifas del manto fúngico, o internamente, por mecanismos de difusión. Es probable que todo el fósforo se desplace a expensas del metabolismo fúngico, en condiciones de baja disponibilidad de fosfatos alrededor de las raíces.

Se han detectado reservas de P, como **gránulos de polifosfato** en vaina e hifas de micorrizas de *Pinus*. Algunos hongos ectomicorrícicos son capaces de emplear **fitato** (hexafosfato de inositol), que constituye importante fuente de fósforo insoluble en suelos forestales. Otras fuentes de P orgánico empleados son: p-nitro fenil fosfato, β-glicerol fosfato, por actividad de fosfatasas.

Es evidente que esta asociación permite explorar el suelo más eficientemente en hábitats en donde ninguno de los integrantes de la pareja podría desarrollarse satisfactoriamente. La asociación debe mantenerse por un prolongado espacio de tiempo, para obtener beneficios sustanciales.

Protección contra fitopatógenos

Se ha puesto en evidencia que las raíces ectomicorrizadas son más resistentes a la invasión por microorganismos fitopatógenos, en relación a las plantas no infectadas. Varias hipótesis tienden a explicar estos hechos:

- el patógeno contaría con **menor disponibilidad de materiales carbonados** en la zona de la raíz, como consecuencia de la absorción de los mismos por el hongo micorrícico

- el manto fúngico ejercería una eficiente **barrera física** a la penetración por el patógeno: en cortes de raíces micorrizadas y controles inoculadas por esporas de hongo patógeno, se aprecia la invasión sólo en el caso de raíces no micorrizadas

- **la secreción de antibióticos** frente a los patógenos, el desarrollo de una microflora rizosférica antagónica

- **la exudación de otros metabolitos** que inhiben a los patógenos, como terpenos, en concentraciones muy superiores a las producidas en raíces no micorrizadas, se ha postulado también como causa de este fenómeno

- **incremento de antagonistas del patógeno** entre la población rizosférica de la planta micorrizada

Colonización y factores que afectan el desarrollo de ectomicorrizas

Se produce a partir de alguna estructura del hongo: micelio, hifas, rizomorfos, esporas, a partir del suelo.

El reconocimiento del hongo y el hospedante apropiado es seguido por la colonización y la formación del manto fúngico. El desarrollo del hongo en la rizosfera del hospedante es estimulado por los exudados radicales.

La **fertilidad del suelo** y la **actividad fotosintética** del vegetal afectan marcadamente a la micorrización.

- **Favorecen el proceso**: alta actividad fotosintética y baja o moderada fertilidad

- **Reducen el proceso**: bajas intensidades luminosas o deficiente fotosíntesis que afectan el nivel de azúcares y la formación de nuevas raíces, altos niveles de N y P en el suelo provocaron disminuciones en el contenido de sacarosa en raicillas de pino y en la susceptibilidad a la infección por el hongo ectomicorrítico *Pisolithus tinctorius.*

Otros factores que inciden en la micorrización incluyen la temperatura, aireación, humedad, el nivel de otros nutrientes, que afectan el desarrollo de las raíces y la propagación del hongo, la microflora rizosférica (sinergismos y antagonismos).

Prácticas de inoculación

En general, los hongos micorrícicos se incorporan a los **cultivos de árboles**, en particular de pinos, abetos y otras coníferas, así como a plantas ornamentales, cuando éstas se desarrollan en medios artificiales como vermiculita, arena, etc. en el **vivero** (Le Tacon, 1997; Marx *et al*, 1991). La falta de micorrización puede acarrear problemas en el transplante de estos cultivos, salvo que el suelo contenga especies ectomicorrícicas.

Técnicas de inoculación (Anexo práctico)

- **con suelo o mantillo o trozos de raíces** colonizadas que se trasladan desde la zona de origen del cultivo, a los viveros. Esta técnica es poco específica y se corre el riesgo de llevar también microorganismos patógenos

- **con esporocarpos, esporas, esclerocios**, frescos o secos que se emplean desde hace muchos años en la inoculación de plántulas. Las esporas son fáciles de coleccionar a partir de esporocarpos maduros de muchos *Gasteromycetes* que se colectan en el terreno en la vecindad de árboles bien micorrizados y se agregan a las macetas regando con un licuado en agua

- **con cultivos puros,** desde la década del 50 se comenzó con éxito a inocular con cultivos puros. Los suelos o los soportes de plántulas se fumigan frecuentemente para eliminar patógenos y la población nativa, que puede competir con el inóculo

Las esporas asexuadas desarrolladas en medios de cultivo son también un buen inóculo, pero los cultivos con micelio se emplean mucho últimamente ya que ofrecen mayores garantías.

Programas de inoculación: comienzan con la selección del hongo ectomicorrícico, la que puede realizarse simultáneamente con un diazotrofo, en leguminosa o en no-leguminosa fijadora de N_2. Los ensayos para evaluar la especificidad y eficiencia de la simbiosis se realizan en plántulas creciendo en tubos con vermiculita/turba, arena, con solución nutritiva. La inoculación se puede realizar a partir de discos de agar con micelio activo. Los ensayos sontinúan en invernáculo, incluyendo suelo, niveles de fertilización, tipos de inóculos, etc.

La introducción de especies de *Pisolithus* en viveros ha incrementado significativamente la calidad de plántulas de pino. El cuadro 2 muestra un ejemplo de inoculación en suelos muy erosionados, cerca de minas de cobre, en el sur de Estados Unidos, pobres en materia orgánica y nutrientes minerales. Como se observa se presentan marcadas diferencias entre los hongos. Las ectomicorrizas con *Pisolithus* incrementaron el crecimiento cerca del 100%, en ambas especies, en relación a las formadas por *Thelephora*, menos adaptado a las condiciones adversas del suelo.

En otras partes del mundo *Pisolithus tinctorius* responde muy bien en la simbiosis, persiste en el suelo a pesar de la competencia de los hongos ectomicorrícicos nativos. Nótese que no aparecen los testigos sin inocular ni fertilizar, ya que los pinos son muy dependientes de los hongos y no se

desarrollan en suelos pobres. Considerando la enorme extensión sembrada con especies forestales, se comprende la importancia de lograr incrementar los rendimientos mediante una correcta selección de estos hongos.

Cuadro 2- Sobrevivencia y desarrollo de plántulas de pino luego de dos años

Tratamiento	altura (cm)	diámetro tallo (cm)	vol.plántula (cm^3)
pino Virginia con			
Pisolithus	52.3*	1.46*	111.5*
Thelephora	44.8	1.15	59.3
pino lobulado con			
Pisolithus	48.7*	1.29*	81.0*
Thelephora	41.3	1.01	42.1

** = Diferencia significativa al 5%. Volumen plántula = (diámetro tallo)^2 x altura.*

Efectos de la inoculación: incrementos en tamaño (altura, peso seco de las plantas), diferencias en la anatomía y morfología de los cultivos, han sido atribuidas a esta simbiosis, cambios en la relación raíz/parte aérea, estructura de tejidos radicales, longitud de acículas, longevidad de raíces cortas, incremento en el número de cloroplastos. Algunas de estas variaciones se atribuyen al incremento del aporte de nutrientes, pero otras son consecuencia de la actividad del hongo o de fitohormonas que libera.

El cuadro 3 muestra ligeros aumentos en la lignificación de plantas de pino inoculadas (en experimentos con CO_2^{14}) y del tamaño y peso del orden del 44%.

Resumiendo: se reconoce la importancia de estas asociaciones en el desarrollo de especies arbóreas, sobre todo en suelos de baja fertilidad. El endosimbionte moviliza nutrientes desde el suelo hacia el hospedante. La inoculación con especies fúngicas correctamente seleccionadas ofrece una interesante perspectiva en el manejo de cultivos forestales en:

a. cultivos exóticos
b. suelos degradados por la erosión, mineralización o por construcciones civiles
c. áreas despobladas o desprovistas del hospedero
d. suelos y sustratos inertes desinfectados
e. en áreas donde ocurren los hongos pero se pretende aumentar la densidad de inóculo o introducir organismos más efectivos que los nativos

Cuadro 3 - Peso seco y contenido de lignina en *Pinus sylvestris* micorrizado y no micorrizado

	peso seco (mg)		lignina (% de peso seco)	
	inoculado	no inoculado	inoculado	no inoculado
peso seco total	770	354	-	-
raíz	265	125	30	28
tallos viejos	91	56	35	30
tallos nuevos	108	44	29,5	24,5
acículas	305	282	-	-

Endomicorrizas

Se piensa, dada la abundancia de estas asociaciones, que la presencia de hongos endomicorrícicos en raíces en condiciones naturales, es una constante, más que una excepción, Han sido reconocidas desde hace más de 100 años y se destaca su presencia en fósiles de más de 300 millones de años.

La mayoría de las endomicorrizas poseen características comunes: el hongo invade las raíces desde el suelo, lo que implica que debe poseer mecanismos para sobrevivir en él o poseer una existencia saprofítica (figura 7). Dentro de la raíz, el hongo coloniza las células de la corteza, pero no las de la endodermis y los vasos, los que no presentan cambios morfológicos (Barea *et al.*, 1991).

Se distinguen dos tipos de endomicorrizas:

- **aquellas con hongos tabicados** pueden subdividirse en las de las *Ericaceae* y familias relacionadas y las presentes en las *Orchidaceae*

- **las que albergan hongos no tabicados**: *Zygomycotina*. Constituyen un grupo heterogéneo, incluyen plan-

tas de muy variada taxonomía y se conocieron como micorrizas **vesículo-arbusculares (V-A),** hoy mejor definidas como **arbusculares (A),** ya que las vesículas pueden o no estar presentes y son las que han recibido mayor atención en los últimos tiempos.

Es realmente importante el volumen de publicaciones sobre este tema desde la década del 70 y distintas ramas del conocimiento se sienten atraídos por estas asociaciones en las cuales el hongo y la planta obtienen mutuos beneficios.

Micorrizas arbusculares (MA)

Estas asociaciones son las más numerosas, las presentan la mayoría de las fanerógamas, de lo que se deduce el enorme potencial económico que puede derivarse de un correcto manejo de ellas en suelos de baja fertilidad. Los estudios se han incrementado mucho en los últimos años y se trata de seleccionar las mejores combinaciones planta-hongo con el objeto de inocular cultivos de interés. En las leguminosas se tienden a usar inoculantes dobles, con rhizobio y esporas del hongo endomicorrícico.

Los hospedantes se encuentran distribuidos en las principales familias cultivadas, las gramíneas y leguminosas. Muy pocas de las familias examinadas carecen de endomicorrizas MA. Se piensa que *Ericaceae, Orquidaceae* y ciertas familias típicamente ectomicorrícicas como *Pinaceae y Betulaceae*, carecen de micorrizas arbusculares.

Han sido descriptas en cultivos muy variados, como maíz, maní, trigo, citrus, manzanos, papas, porotos, soja, café, caña de azúcar, hasta plantas silvestres, árboles como roble, fresno y plantas herbáceas, en variadas zonas ecológicas. Generalmente sólo están ausentes en suelos muy húmedos, en plantas sumergidas. Son más abundantes en suelos de baja fertilidad, como todos los tipos de micorrizas, y algunas prácticas agrícolas, como la fertilización, pueden disminuir su incidencia.

Como la morfología de las raíces cambia muy poco, pasaron mucho tiempo inadvertidas y además la **dificultad del endofito para desarrollarse en medio de cultivo**, limitó los estudios.

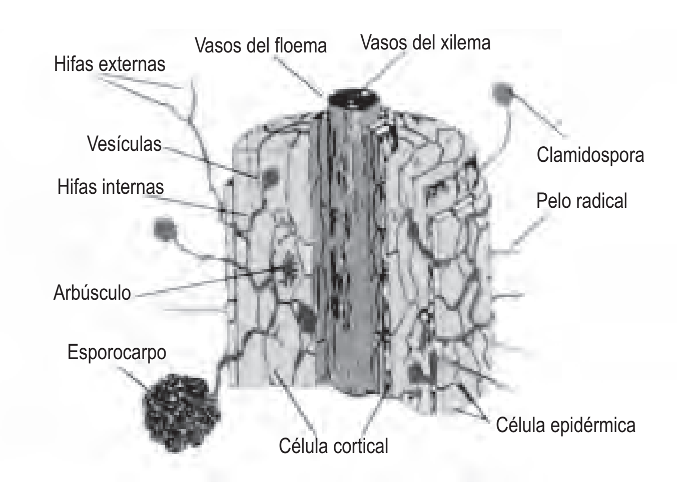


Figura 7- Esquema de una micorriza arbuscular (MA)

Cuadro 4 - Sistemática de *Zygomycotina* micorrícicos y tipo de micorrizas formadas

Orden	Suborden	Familia	Género	Micorriza
Glomales	*Glominae*	*Glomaceae*	*Glomus*	*A*
			Sclerocystis	*A*
		Acaulosporaceae	*Acaulospora*	*A*
			Entrophospora	*A*
	Gigasporinae	*Gigasporaceae*	*Gigaspora*	*A*
			Scutellospora	*A*
Endogonales	*Endogonaceae*	*Endogone*		*A, EC*

El endofito

Los hongos son no-tabicados, se los ubica entre los ***Zygomycotina***, del orden *Glomales* (familias *Glomaceae, Acaulosporaceae y Gigasporaceae*) *y Endogonales* (familias *Gigasporaceae y Endogonaceae*) (cuadro 4). No se les conoce estado sexual (Honrubia *et al.*, 1994).

Como estos hongos no han logrado crecer en medios de cultivo la taxonomía se basa en características de las esporas (figura 8), que se colectan de suelo rizosférico por técnicas de **tamizado húmedo y decantación**. El empleo de gradientes de sacarosa ayuda a separar las esporas de partículas inertes, huevos de insectos, etc. Se emplean combinaciones de técnicas (Anexo práctico). El empleo de sondas moleculares ha permitido la identificación del microsimbionte y ha contribuido mucho en los estudios de inoculación.



Figura 8- Espora del hongo *Gigaspora*

Glomus puede presentar esporocarpos o no con clamidosporas generalmente terminales en una hifa indiferenciada, las de *Sclerocystis* se ubican dentro de esporocarpos, en capa simple. *Gigaspora* posee azigosporas en extremo de célula alargada en una hifa que se proyecta hacia la espora y *Acaulospora* no forma esporocarpo y las esporas están ubicadas en hifas próximas a una vesícula de gran tamaño.

Con estas esporas es posible realizar ensayos de síntesis de endomicorrizas y probar la eficiencia de distintas combinaciones planta-endofito. El empleo de macerados de raíces micorrizadas no ofrece las mismas garantías. La inoculación con esporas desinfectadas mostró que el rango de hospedantes para la mayoría de los aislamientos estudiados es amplio, hecho que contradice la incapacidad del hongo para desarrollarse fuera del hospedante.

Ciclo de vida de un hongo que forma micorrizas arbusculares

Es necesario efectuar observaciones al microscopio de cortes coloreados de raíces colonizadas, previamente tratados con KOH a los efectos de clarificar las células, eliminando polímeros de la pared ya que las raíces no permiten visualizar estructuras internas. Las hifas del hongo penetran desde el suelo y se presentan tanto inter como intracelularmente, en la corteza. La endodermis, meristema y vasos no son colonizados. Se coloniza la zona apical de raíces jóvenes.

Se distinguen varias fases (figura 9, Duhoux y Nicole, 2004)

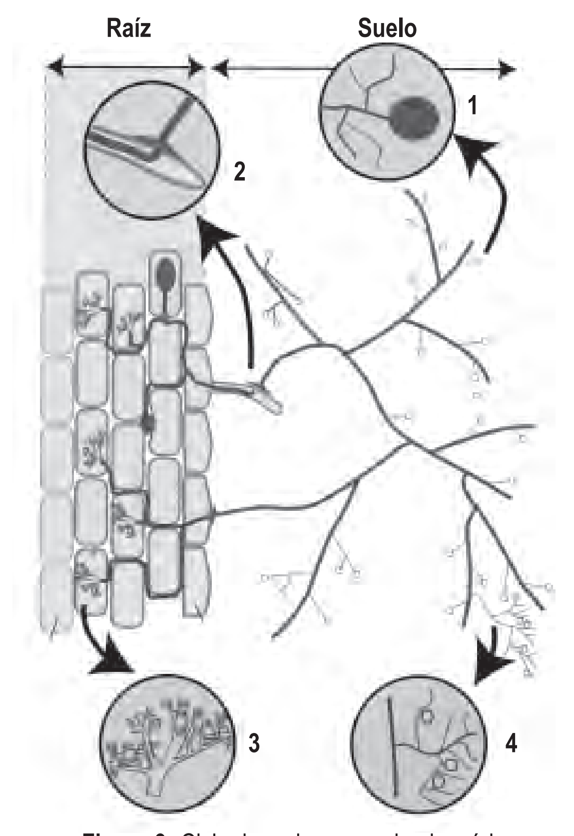


Figura 9- Ciclo de un hongo endomicorrícico

- **Germinación de las esporas** y crecimiento de las hifas: las esporas plurinucleadas germinan en el suelo o *in-vitro*, se forma un tubo germinativo cenocítico. El hongo responde a exudados radicales aumentando significativamente el crecimiento de los filamentos y las ramificaciones. Se éste no se encuentra con una raíz compatible, el crecimiento se detiene.

- **Entrada a la raíz**: en la proximidad de una raíz compatible, el crecimiento del tubo germinativo es estimulado por variados factores, como CO_2, exudados, etc. y las ramificaciones sucesivas penetran en la raíz. Se observan estructuras especializadas llamadas apresorios, englobamientos redondeados de hifas, cuya pared impregnada de melanina se espesa y asegura una presión osmótica elevada. Los apresorios se forman por moléculas liberadas por el hospedero. Los filamentos se propagan en la exodermis y el parénquima cortical, sin llegar nunca a la endodermis. Hidrolasas degradan la pared de la planta provocando la progresión del filamento fúngico, bajo el efecto de una presión hidrostática elevada.

- **Colonización radical**: en el desarrollo del hongo simbiótico, aparecen las estructuras típicas de estas asociaciones, los arbúsculos y las vesículas.

- **Desarrollo de hifas externas**: la colonización se completa por activo desarrollo de hifas extraradicales, muy ramificadas y finas que están involucradas en la nutrición mineral del hongo. Constituyen una nueva estructura funcional en la nutrición mineral de la planta (N, P).

Resumiendo: el hongo endomicorrícico presenta dos tipos de hifas: las de infección con crecimiento centrípeto en relación a la raíz y las hifas extraradicales, de crecimiento centrífugo. El aporte de esqueletos carbonados por parte de la planta asegura el equilibrio de esta simbiosis.

- La última etapa se caracteriza por la **degradación de los arbúsculos**, la célula colonizada retoma la estructura habitual.

Se reconocen tres fases en el desarrollo de las endomicorrizas

- **una latencia inicial** atribuida al desarrollo de las plántulas y germinación de esporas, el crecimiento del tubo de germinación y la colonización (20-25 días)

- **intenso desarrollo** de la micorriza, de unos 30 días, coincide con crecimiento de la parte aérea y del micelio externo, facilitando las colonizaciones

- **fase de equilibrio**, donde la proporción de raíces micorrizadas y no micorrizadas permanece constante, coincide con la etapa de fructificación del hospedante y continúa hasta la senectud.

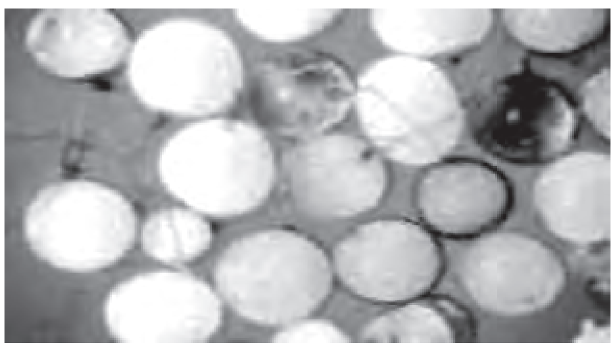
Las endomicorrizas colaboran con la nutrición del vegetal durante el período de máximo desarrollo.

Las **estructuras fúngicas** características son (figura 10)

Los arbúsculos que se forman por repetidas divisiones dicotómicas de una hifa, presentan el aspecto arborescente característico, llamados también **haustorios o apresorios,** con gran superficie de intercambio con el hospedante y es a este nivel que se realizan la transferencia de nutrientes (C, P, etc.). Presentan viabilidad sólo por algunos días, son digeridos por la planta y su formación recomienza.

Las ramificaciones de los arbúsculos están limitados por una membrana periarbuscular de origen vegetal que rodea la pared fúngica muy fina y acompaña a la hifa. Esta membrana presenta modificaciones funcionales importantes: se ha detectado actividad ATPasa muy activa, ausente en raíces no micorrizadas,que podría estar implicada en el transporte a través de la membrana en esta simbiosis (fosfatos hacia la planta).

Las vesículas son estructuras de gruesas paredes, que se desarrollan en extremos de hifas inter o intracelularmente, a medida que la infección progresa, aunque se las ha descripto en etapas tempranas de la colonización. Se encuentran en general en las capas superficiales de la raíz y funcionan como órganos de almacenamiento de grasas, aceite y colaboran en la propagación del endofito. El hongo determina su formación y morfología. Algunos hongos como *Gigaspora* y *Scutellospora* no las forman.



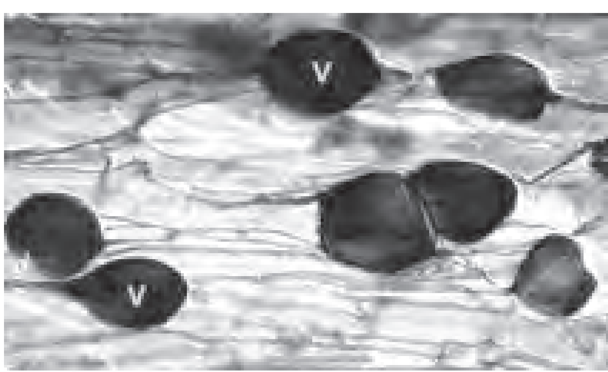




Figura 10- Estructuras de hongos endomicorrícicos: esporas, vesículas y arbúsculos.

Las hifas que se desarrollan dentro de la raíz están conectadas a un fino micelio que se extiende en el suelo vecino. Los ápices radicales no se presentan frecuentemente colonizados, como tampoco las raíces gruesas

Las esporas presentes en las células colonizadas y en el suelo vecino. Su morfología permite la caracterización de especies (Schenck y Pérez, 1988) luego de trabajoso procedimiento de aislamiento a partir se suelo rizosférico por tamizado húmedo (Anexo práctico).

Se suele determinar la longitud de la raíz con alguna de las estructuras de los hongos que forman micorrizas tipo MA, observando segmentos de 1 cm a intervalos regulares. Esta longitud puede llegar a un tercio del total en muchas plantas cultivadas y superar 70-80% (Honrubia *et al.,* 1994; Sieverding y Barea, 1991), en plantas inoculadas, en vivero.

Ecología

Muchos son los factores que afectan la formación y desarrollo de las micorrizas MA. La fotosíntesis es uno de los más importantes, pero el manejo de los cultivos (fertilización, biocidas, rotaciones), la abundancia de inóculo en los suelos, la susceptibilidad de la planta, las condiciones de temperatura, humedad, pH, estación del año, afectarán el grado y la eficiencia de la asociación.

Fotosíntesis: con CO_2 marcado se demostró la transferencia de compuestos carbonados hacia el hongo. Sombreado o corte de la parte aérea afectan la micorrización. El efecto estacional incide en la colonización, ésta aumenta en la estación de activo crecimiento vegetal.

La incidencia de la micorrización es mayor cuando la actividad biológica del cultivo es más intensa, con preponderancia de arbúsculos, responsables de los intercambios nutritivos con el hospedante. Las hifas y esporas contribuyen a la propagación del endofito y las vesículas almacenan nutrientes que el hongo moviliza en condiciones adversas.

Otros factores del ambiente, como **la luz y la temperatura**, afectan el desarrollo del hospedante y por ende la disponibilidad de nutrientes para el hongo. Existe correlación entre grado de colonización y nivel de hidratos de carbono en jóvenes plántulas.

La temperatura del suelo parece afectar más la actividad fisiológica de la micorriza que su desarrollo

La aireación: la escasa colonización en suelos inundados está relacionada a la falta de oxígeno

La fertilización afecta el establecimiento del hongo. La inhibición por fosfatos solubles ha sido bien documentada: cuando la concentración de P en los tejidos vegeta-

les se vuelve muy alta, la morfología del hongo cambia drásticamente y eventualmente muere. Los fertilizantes nitrogenados también afectan a esa simbiosis, pero no existe acuerdo sobre los mecanismos involucrados. Se especula sobre la teoría de los hidratos te carbono de Björkman: el nitrógeno, al incrementar la síntesis de proteínas, disminuiría el aporte de azúcares que estimulan la colonización endomicorrícica. En condiciones naturales, se observa variación en la sensibilidad de los distintos endofitos frente al nitrógeno.

Los pesticidas también afectan al proceso: muchos fungicidas e insecticidas han sido referidos como inhibidores. Es necesario tener en cuenta estos efectos en las prácticas de inoculación.

Las interacciones con otros microorganismos del suelo afectan la germinación y crecimiento de esporas de hongos que forman micorrizas MA:

La inoculación con esporas de hongos endomicorrícicos y rhizobios ha tenido éxito en la implantación y rendimientos de leguminosas: los rhizobios favorecerían la micorrización por la producción de polisacáridos y de poligalactouronasa en el sitio de infección. Otras enzimas, como las pectinolíticas, producidas por bacterias del suelo, favorecen también la micorrización (proceso relacionado en gran parte a la producción de enzimas, ya que los hongos no parecen entrar por heridas).

Se apreció que el cultivo respondió positivamente a la acción conjunta de rhizobio y endomicorriza MA, en presencia de fosfato de roca, incrementando su peso seco y nodulación. La inoculación conjunta permitió un aprovechamiento más eficiente y rápido del fertilizante fosfatado.

Beneficios mutuos

Beneficios para la planta

En general cultivos creciendo en suelos deficientes en P responden rápidamente a la inoculación y en las primeras semanas ya se aprecian diferencias en el desarrollo de plántulas inoculadas y a los pocos días se visualizan los arbúsculos intracelulares. En general, se encuentra que la respuesta a la micorrización está inversamente correlacionada con el contenido de P lábil del suelo.

Absorción de P por las hifas El P^{32} se acumula en estructuras fúngicas, a partir de la fracción soluble, en ensayos de corta duración. La fracción asimilable o intercambiable de fosfato representa sólo entre el 1 y el 5% del contenido total de P en los suelos. Los hongos MA, al mismo tiempo que incrementan la capacidad de absorción de fosfato asimilable, pueden también solubilizar fuentes no disponibles o escasamente disponibles. Las plantas micorrizadas responden al agregado de fuentes insolubles de P como fosfato de roca, hidroxiapatita.

Translocación de P a lo largo de las hifas. Las hifas acumulan grandes cantidades de P que podría interferir en el metabolismo celular, lo que se evita por su rápida conversión en **polifosfato,** osmóticamente inactivo. Los gránulos, contenidos en vacuolas que pueden representar entre un 16 y 40% del total de P en estos hongos, se evidencian en el microscopio electrónico. La translocación tiene lugar por corrientes citoplasmáticas rápidas. Los hongos poseen las enzimas necesarias para la síntesis y degradación de los polifosfatos, asi como fosfatasas, cuyo nivel disminuye con la fertilización fosfatada.

Transferencia de P a la planta. La interfase entre ambos facilita los intercambios, se ha referido un incremento en la permeabilidad de la membrana de la hifa inducida por el hospedero, la transferencia de fosfatos estaría acoplada de alguna manera a la transferencia de carbohidratos desde el mismo.

Otros beneficios:

* **numerosos minerales** son absorbidos en mayor grado por plantas micorrizadas con hongos tipo MA, pero no existen referencias sobre absorción incrementada de iones móviles en el suelo, como los nitratos. La toma de **agua** parecería estar incrementada y la resistencia a condiciones de sequedad se atribuye a la capacidad de la planta micorrizada para mantener un adecuado nivel de fósforo ya que la baja humedad disminuye la movilidad de los iones fosfato, más que a un efecto directo sobre la absorción del agua.

* **detoxificación del medio:** remoción de inhibidores, presentes en el suelo o producidos por los métodos de esterilización, ejemplo, metales pesados

* **producción de sustancias bióticas**, solubles en agua o volátiles, como aminoácidos, vitaminas, fitohormonas

* **cambios en el pH**, como en el caso de los solubilizadores de fosfatos (capítulo 12)

* producción de **fitohormonas**, como lo hacen bacterias y otros organismos del suelo. Su balance resulta de fundamental importancia en la regulación del crecimiento vegetal

Las células de la corteza colonizadas con hongos que forman MA incrementan las mitocondrias, retículo endoplasmático, clorofila, respiración, tamaño del núcleo y disminuyen su contenido en almidón y la invasión por hongos patógenos.

Los hongos micorrícicos tanto ecto como endomicorrícicos, pueden contribuir entonces a:

● **la mineralización de P orgánico** por actividad de fosfatasas localizadas en arbúsculos maduros e hifas intercelulares y

● **la solubilización de P insoluble** (fosfato tricálcico, hidroxiapatita, polvo de roca) mediante la producción de ácidos. La selección de inoculantes se realiza incluyendo estas propiedades.

Beneficios para el hongo

Ya señalados en el caso de los hongos ectomicorrícicos: reciben de la planta nutrientes, sobre todo **hidratos de carbono** en las primeras etapas de la colonización. La estimulación en la producción de clorofila y una alteración en la permeabilidad de las membranas evitan pérdidas de energía en la fotofosforilación y explican el hecho de que una incrementada actividad fotosintética compensa el flujo de carbono hacia el hongo, evitando disminuir la materia seca de la planta.

Se ha demostrado con CO_2 marcado que el hongo emplea entre un 4 y un 20% de las hexosas producidas por la planta. Los arbúsculos son el sitio de intercambio carbonado entre ambos simbiontes, donde se regula la hidrólisis de la sacarosa de la fotosíntesis, por estimulación de la invertasa de la planta como consecuencia de la acidificación de la interfase del arbúsculo.

Inoculación

La principal limitante en la inoculación de plantines con hongos endomicorrícicos es la incapacidad de desarrollarse en cultivo puro en medios de laboratorio, por lo que no se cuenta al presente con inoculante a base de micelio.

Existen, sin embargo, numerosas publicaciones sobre efectos en los rendimientos de varios cultivos luego de la inoculación con *Endogonaceae,* sobre todo a nivel experimental. La inoculación es promisoria en el caso de plantas de valor económico: ornamentales y micropropagadas (citrus, café, etc.). No se puede pensar por el momento su uso en cultivos extensivos. Para que la inoculación sea exitosa se deben reunir una serie de condiciones:

● **ausencia o bajo potencial de inóculo de hongos endomicorrícicos nativos**

● **alta competencia** del inóculo en caso de que la población nativa sea alta y gran capacidad para estimular la toma de nutrientes y el crecimiento vegetal.

Las características requeridas para emplear un hongo que forma MA como inoculante son similares a las exigidas a cepas de rhizobios: **infectividad, efectividad, colonización y sobrevivencia en la rizosfera y en el suelo**.

Existe poca especificidad entre las asociaciones arbusculares y las plantas. En cultivos anuales, la sobrevivencia debe ser considerada para eliminar los costos de reinoculación.

La selección inicial debe incluir hongos que produzcan esporas que germinen rápidamente, hifas que crezcan bien en el suelo y que colonicen extensivamente al sistema radical. Las condiciones experimentales para

la selección de cepas son las mismas que para rhizobios.

El nivel de fósforo de los suelos empleados debe ser similar al de los suelos que van a ser inoculados. Generalmente se esterilizan los suelos en los ensayos maceteros, pero se aconseja incluir un control no esterilizado para comparar el comportamiento del inóculo con la población nativa de hongos arbusculares (Sieverding, 1991).

El inóculo:

- **esporas** colectadas mediante técnicas trabajosas de tamizado a partir de suelo rizosférico

- **raíces colonizadas** picadas

- **mezcla de suelo con raíces de plantas trampa** (sorgo, cebolla, etc.) inoculadas con esporas, crecidas y luego sometidas a estrés (sequedad) a los efectos de que el hongo esporule (Anexo práctico).

El cuadro 5 publicado por Frioni, (1990), muestra los resultados de inoculación de plántulas de soja con *R. japonicum* y una mezcla de esporas, hifas, micelio de hongos endomicorrícicos *Glomus fasciculatus* (E3) y *Glomus mosseae* (YV) y de trozos de raíces colonizadas, con distintas dosis de fosfato de roca y el cuadro 6 informa los resultados de inoculación de *Pinus strobus* con hongos ectomicorrícicos (Smith y Read, 1997).

La figura 11 (Dommergues *et al*., 1999) presenta los resultados de inoculación de una especie de *Acacia* con *Rhizobium* y *Glomus mosseae* en suelo pobre en P y N tratado con bromuro de metilo a los efectos de matar a la población nativa.

Cuadro 5 - Efecto la inoculación con rhizobio y hongos endomicorrícicos en plantas de soja (media de 5 repeticiones), nivel de fosfato de roca 0,12%

Tratamiento	Peso seco parte aérea (mg)	Peso seco raíz (mg)	Nº nódulos por planta	% colonización micorrícica
Testigo	155	60	0	0
rhizobio (Rh)	161	64	6	0
ME3	162	63	0	62
MYV	161	68	0	67
ME3 + Rh	320	117	16	88
MYV + Rh	357	136	16	90

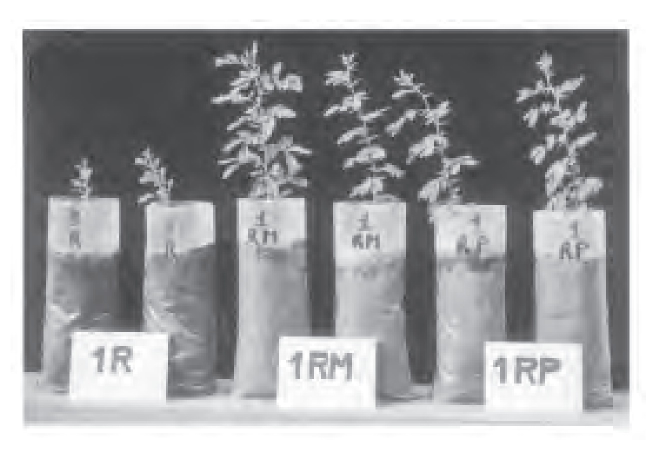


Figura 11- Inoculación de *Acacia tortillis* en suelo pobre en P y en N. 1R= inoculadas con rhizobio específico: 1RM=inóculo doble, con rhizobio y el hongo endomicorrícico, 1RP= plantas con rhizobio y KH_2PO_4 (10mg P.kg suelo^{-1})

Cuadro 6- Crecimiento de plántulas de *Pinus strobus* ectomicorrizado y minerales absorbidos

Plántulas	Peso seco planta (mg)	Peso seco raíces (mg)	N (mg/planta)	Fosfato (mg/planta)	Potasio (mg/planta)
ectomicorrizadas	404	175	5,00	0,789	2,97
no micorrizadas	331	166	2,45	0,239	1,55

Resumen: perspectivas y aplicaciones de los distintos tipos de micorrizas

1) Aumento del área de exploración del suelo: por los filamentos vegetativos extra radicales, cerca de 1.000m de micelio/m de raíz. Es la principal función de las micorrizas, que de esta manera aumentan la nutrición mineral de los vegetales.

2) Nutrición nitrogenada y fosfatada: el hongo asimila formas de N que la planta usa mal y pone a disposición de las mismas aminoácidos, péptidos y proteínas, aumenta además, el nivel de nitrógeno mineral absorbido. La planta absorbe más fosfatos gracias a la capacidad de los hongos de usar formas orgánicas y minerales del P del suelo (ortofosfato) no asimilables por los vegetales, acumulan P móvil (polifosfatos) y lo transfieren enseguida a la planta (figura 12). Presentan fosfatasas.

3) Otros beneficios: producción de fitohormonas (auxinas), aumento de resistencia a estrés hídrico, a toxicidad a minerales como aluminio, manganeso, a la acidez, salinidad, protección frente a fitopatógenos.

4) Costo para la planta: estudios con CO_2 marcado con C^{14} demostraron que entre un 20 y 40% de los azúcares fotoasimilados son usados por el hongo. En las endomicorrizas arbusculares, son los arbúsculos los lugar es de intercambio carbonado entre ambos integrantes.

5) Inoculación: la misma se efectúa en plántulas en vivero. La mayor aplicación se da actualmente en la producción forestal, inoculando los plantines con: suelo y mantillo de bosques establecidos, carpóforos picados, o inoculantes a base de micelio puro de hongos .ectomicorrícicos seleccionados. El efecto de las endomicorrizas arbusculares no ha sido aún establecido en la agricultura a gran escala, pero se estima, que su introducción puede disminuir los niveles de fertilizantes requeridos sobre todo en la fase de establecimiento de los cultivos. La incapacidad de los hongos que forman micorrizas del tipo A de desarrollarse en cultivo puro constituye la principal limitación en estudios fisiológicos, genéticos, taxonómicos y por supuesto en la preparación de inoculantes.

6) Micorrizas y plantas micropropagadas: muchas especies hortícolas y forestales son micropropagadas *in-vitro*, en medio con agar y azúcares y luego transplantadas a sustrato adecuado. Esta etapa constituye una fase de aclimatación y con el fin de evitar estrés hídrico y nutricional, se las inocula con hongos endomicorrícicos (esporas, plantas trampa micorrizadas y picadas)

7) Producción de hongos comestibles: muchos hongos ectomicorrícicos son también comestibles, de modo que las fructificaciones de ellos en bosques con especies inoculadas son cosechadas y aportan otra fuente de ingreso al productor forestal (*Lactarius deliciosus*, trufas, como *Suillus luteus*, *Cantharellus cibarius*). Otros hongos comestibles son saprofitas y algunos hasta patógenos: *Agaricus, Amanita, Tricholome*, por lo que no ofrecen esta dualidad de empleo: micorrización y comercialización.

A modo de repaso el cuadro 6 compara características de las ectomicorrizas y las endo del tipo arbuscular (A) y en el figura 12 (Duhoux y Nicole, 2004) se compara el funcionamiento de ambos tipos de micorrizas. Las ectomicorrizas excretan enzimas hidrolíticas que le permiten absorber formas orgánicas del N y P. La absorción de formas solubles puede realizarse también a partir de quelatos (complejos organo minerales). Las hifas de los hongos endomicorrícicos de tipo arbuscular secretan fosfatasas. También se mejora la asimilación de ciertos oligoelementos como Cu, Zn.

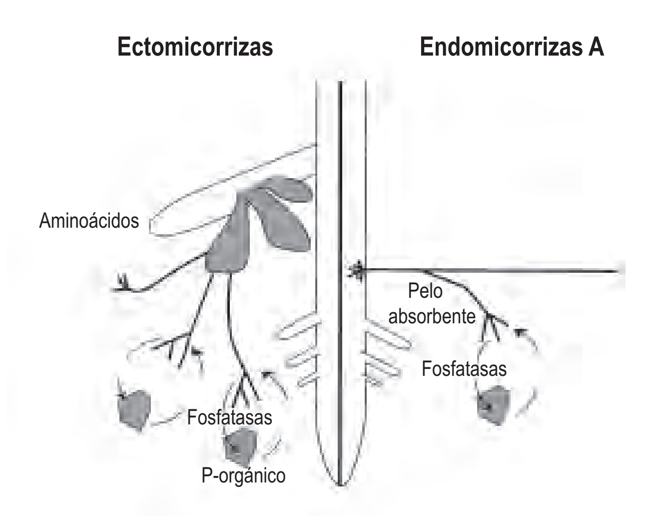


Figura 12 - Funcionamiento de ecto y endomicorrizas

Cuadro 6 - Características de ecto y endomicorrizas

Endomicorrizas	**Ectomicorrizas**
Presentes en un 97% fanerógamas y algunos árboles	Presentes en aprox.3% de fanerógamas, sobretodo forestales
No visibles a simple vista	Visibles macroscópicamente
Estructuras dentro células corticales de la raíz: arbúsculos, vesículas, y esporas	Manto fúngico, a veces coloreado, red de Hartig; hifas intercelulares, rara vez penetran en las células
Forman carpóforos, esporas y/o elementos de rersistencia en el suelo, no visibles	En general forman carpóforos visibles (aéreos o hipogeos)
Hongos no tabicados *Zygomycotina* (Endogonales)	*Basidiomycotina, Ascomycotina* micelio tabicado
Aislados de suelo y raíz no crecen en medios usuales de cultivo	Idem, cultivados en medios de laboratorio a partir de esporas o hifas
Fructifican en presencia del hospedante	No fructifican en medios de laboratorio, salvo excepciones
Inoculación en pequeña y mediana escala con esporas o suelo y raíces de plantas trampa	Inoculación con mantillo, esporas o cultivos de micelio y/o esporas. Inoculantes comerciales
Pueden conservarse a baja temperatura por 1-2 años	Pueden conservarse mucho tiempo en medios artificiales
No se conocen especies venenosas ni comestibles	Algunas especies comestibles y otras altamente venenosas
Requieren al hospedante para crecer	No lo requieren

Bibliografía

Agerer, R. Characterization of Ectomycorhiza. En: **Techniques for Mycorrhizal Research**, 1994, J. R. Norris, D. Read y A. K. Varma (eds), Academic Press: 25-73, London

Allen, M.F. (ed) **Mycorrhizal Functioning, An integrative Plant-Fungal Process**, 1991, Chapman & Hall, New York, 534 pp.

Alvarez, I. F. Ecología, fisiología e implicancias prácticas de las ectomicorrizas. En: **Fijación y Movilización de Nutrientes**, vol II, 1991, Colección Nuevas tendencias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid: 247-259

Bago, B.; Pfeffer, P. E.; Shachar-Hill. Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. 2000, Plant Physiology 124: 949-957

Barea, J. M., C. Azcon-Aguilar, J. A. Ocampo y R. Azcon Morfología, anatomía y citología de las micorrizas vesículo-arbusculares. En: **Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes, Vol II**, 199, Colección Nuevas Tendencias, vol 18, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid: 149-173

Dommergues, Y. y Mangenot, F. **Ecologie microbienne du sol**. 1970, Masson, París

Dommergues, Y. Duhoux, E. Y Diem, H. G. **Les arbres fixateurs d´azote**. 1999 Co-edición CIRAD/FAO/IRD/Espaces 34, París

Duhoux, E. y Nicole, M. **Biologie Végétal: Associations et Interactions chez les Plantes**. 2004, Dunod, París: 54-93

Frioni, L. **Ecología microbiana del suelo**, 1990 Ed. Universidad de la República, Montevideo

Honrubia, M., P. Torres, G. Diaz y A: Morte, **Biotecnología Forestal: Técnicas de Micorrización y Micropropagación de Plantas,** 1994, Universidad de Murcia, 167 pp.

Le Tacon, E. (editor) **Champignons et mycorrhizes en fôret.** 1997 Revue Forestière Française, Nº especial. Ed. Ecole Nacional du Génie Rural, des eaux et forêts. Nancy

Malvárez, G., Major, G., Curbelo, V. y Frioni, L. Hongos ectomicorríticos en *Eucalyptus grandis.* 1997, Agrociencia 1:38-43, Facultad de Agronomía, Montevideo

Marx, D. H., J. L. Ruehle y C. E. Cordell, Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhyza. En: **Methods in Microbiology, vol 23**, **Techniques for the Study of Mycorrhyza**, 1991, J. R. Norris,D. J. Read y A. K. Varma (eds), Academic Press, London: 383-412.

Norris, J.R., D. Read y A.K. Varma (eds) **Techniques for Mycorrhizal Research**, 1994, Academic Press, London, New York

Schenck, N.C. y Y. Perez **Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi,** 1988 Univ.Florida, Ganesville, 241 pp

Sieverding, E. **Vesicular-arbuscular mycorrhizal management in tropical agrosystems.** 1991 GTZ Gmbh, Eschborn, 371 pp.

Siqueira, J. O., F. M. de S. Moreira, B. M. Grisi, M. Hungria y R. S. Araujo Micorrizas. En: **Microorganismos e Processos Biológicos do Solo: Pespectiva Ambiental,** 1994 EMBRAPA-SPI, Brasilia, DF: 95-117

Smith, S.E. Y Read, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 1997, Academic Press

Preguntas de repaso

1) En qué momento de la evolución las plantas necesitaron de hongos asociados? Qué ventajas adquirieron?
2) Por qué a las micorrizas se les cataloga también como parasitismo controlado?
3) Describa en pocas palabras los tipos más frecuentes de micorrizas
4) Diferencias entre los endosimbiontes fúngicos en las ecto y endomicorrizas arbusculares
5) Posiblidades de aislamiento y propagación de ellos a los efectos de obtener inoculantes a base de micelio puro y seleccionado
6) Por qué los plantines (pino, eucalipto, robles) en los viveros más tecnificados presentan bajo porcentaje de micorrización?
7) Formas de incrementar este índice
8) Cómo establecería si los carpóforos dominantes en bosques establecidos son micorrícicos?
9) Si pudiera escoger hongos ectomicorrícicos entre hongos saprofitas y otros comestibles, cual escogería como inoculante y por qué?
10) Perspectivas y futuros desafíos en los estudios con hongos endomicorrícicos arbusculares.

17 Microorganismos promotores del crecimiento vegetal

En este capítulo analizaremos el manejo de las interacciones benéficas entre los microorganismos y los vegetales a los efectos de disminuir enfermedades en los mismos causadas por microorganismos del suelo. Los mismos criterios se emplean para control de enfermedades provocadas por integrantes de la fauna (nemátodos, colémbolos), insectos, etc., que escapan a esta revisión.

Los microorganismos del suelo están relacionados con las plantas y sus interacciones, como vimos (capítulo 13) pueden ser benéficas, neutras o perjudiciales.

Los efectos de los microorganismos rizosféricos sobre a las plantas pueden resumirse en:

Neutros: no afectan el crecimiento

Benéficos: existe creciente evidencia de que la microflora saprofita de la rizosfera incluye componentes benéficos que pueden incrementar el crecimiento vegetal y los rendimientos significativamente

Deletéreos: que pueden afectar negativamente el crecimiento vegetal, sin necesariamente parasitar al tejido (alteraciones en el aporte de agua, iones y sustancias promotoras del crecimiento vegetal, cambiando las funciones y/o limitando el crecimiento de raíces)

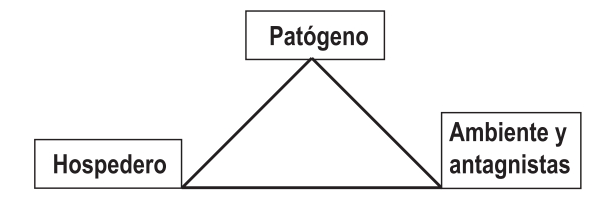
Patógenos: disminuyen el rendimiento por producción de enfermedades: numerosas bacterias, actinomicetes, hongos producen enfermedades que provocan importantes pérdidas en los cultivos

En el cuadro 1 se ejemplifican algunos de estos efectos y en el cuadro 2 se señalan algunos de los microorganismos con distintos efectos sobre los vegetales .

Cuadro 1 - Efecto de los microorganismos sobre las plantas

Benéficos	FBN, antibiosis, sustancias promotoras, biocontrol, estabilización del suelo, liberación de nutrientes (mineralización, solubilización),degradación de fitotóxicos
Neutros o variables	adhesión, liberación de enzimas, competencia, alelopatías, flujo de nutrientes
Perjudiciales	fitotoxicidad, infección

Se sabe que la enfermedad está relacionada a complejas interacciones de tres componentes (triángulo de enfermedad):



Como el suelo cambia menos rápidamente que la atmósfera sobre él, los microorganismos están adaptados a este habitat relativamente estable. Las poblaciones de antagonistas, patógenos y plantas fluctúan dentro de ciertos límites en respuesta a las interacciones bióticas y abióticas. Ligeros cambios en las condiciones del ambiente pueden ejercer profundos efectos en poblaciones de patógenos o antagonistas aislados. Los cambios producidos por la agricultura son en general rápidos, variados y permiten en poco tiempo recuperar el equilibrio biológico. Pero el uso intensivo de fertilizantes, pesticidas, irrigación, labranzas y otras prácticas que tienden a incrementar los

rendimientos han resultado en incrementos en la severidad o incidencia de enfermedades vegetales. Los monocultivos estimulan ciertas enfermedades que ocurrirían raramente en ecosistemas no perturbados.

Cuadro 2- Microorganismos con efectos benéficos, deletéreos y patógenos sobre plantas

Benéficos

Bacterias fijadoras de N_2:
- no simbióticos: *Azospirillum, Azotobacter, Clostridium, Acetobacter*
- simbióticos: *Rhizobium, Bradyrhizobium, Frankia, Azorhizobium*

Rizobacterias estimulantes del crecimiento vegetal (*PGPR* en inglés)
- solubilización de Pi
- liberación sustancias estimulantes crecimiento
- mayor absorción de agua y de nutrientes
- antagonistas de patógenos
- degradación de sustancias fitotóxicas

Hongos micorríticos
- ectomicorríticos: *Pisolithus, Suillus, Laccaria*
- endomicorríticos: *Glomus*, *Acaulospora*

Microorganismos empleados en control biológico
- antagonistas de bacterias (*Agrobacterium tumefaciens*)
- antagonistas de hongos (bacterias, otros hongos)

Microorganismos en la rehabilitación de suelos
- revegetación
- manejo de residuos tóxicos
- solubilización de fosfatos

Técnicas de estimulación de estos microorganismos
- manejo de residuos (abonos, pajas)
- inoculación

Deletéreos

Asociados al mantillo
- inmovilizantes del N
- síntesis de sustancias tóxicas (ácidos orgánicos, toxinas)

Rizobacterias
- reductoras de S, Fe, Mn
- antagonistas de microorganismos promotores

Patógenos
- bacterias
- hongos
- los virus (entidades biológicas)

La ocurrencia de una enfermedad en vegetales indica que alguno de las siguientes condiciones coexisten (Graham y Mitchell, 1998):

- El patógeno es altamente virulento o está presente en alta densidad
- Las condiciones abióticas del ambiente son más favorables para el patógeno que para el hospedante o el antagonista
- El hospedante vegetal es genéticamente homogéneo, altamente susceptible y extensivamente sembrado
- El antagonista está ausente o lo está en bajo número por falta de condiciones favorables o por inhibición por otros microorganismos

El equilibrio biológico en situaciones de enfermedades vegetales puede manipularse a través del uso integrado de controladores químicos, como los fungicidas, bactericidas, nematomicidas, controles culturales, como las rotaciones de cultivos, enmiendas orgánicas y mediante métodos de control biológico, como los que incrementan la resistencia natural de los cultivos o mediante la introducción por inoculación de microorganismos antagonistas de los patógenos.

El control biológico es de más reciente adopción y sólo representa una fracción muy baja (2-10%) del control químico, opera más lentamente, pero es más seguro, no contaminante y de larga duración en relación a los anteriores.

Promoción directa del crecimiento vegetal

Las rizobacterias benéficas que promueven el desarrollo vegetal se designaron como **rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (***PGPR, plant growing promoting rhizobacteria***)** y son extensamente estudiadas por sus efectos benéficos en rendimientos de importantes cultivos (Schippers *et al*., 1987). Hablaremos de **microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV),** para incluir a otros grupos, como los hongos.

Los microorganismos benéficos afectan el desarrollo vegetal por:

- aumento de la disponibilidad y toma de nutrientes minerales
- provisión de sustancias promotoras del crecimiento
- supresión de microorganismos deletéreos o patógenos en la rizosfera

Las características de un microorganismo promotor del crecimiento vegetal (MPCV) se resumen en el cuadro 3.

Cuadro 3- Cualidades de microorganismos promotores del crecimiento vegetal

* Desarrollo en la rizosfera, deben tener la capacidad de colonizar activamente la rizósfera y el rizoplano

* Sobrevivir a la inoculación sobre las semillas, en el suelo, en la espermatósfera en respuesta a exudados radicales

* Activos competidores, para persistir deben encontrarse en valores altos (10^3-10^6 ufc/g raíz fresca). Son sobretodo bacterias y hongos

* Gram negativos, como *Pseudomonas flouorecens, Pseudomonas* no fluorescentes, *Azospirillum*, miembros de las *Enterobacteriaceae: Enterobacter agglomerans, E. cloacae, Erwinia herbicola, Serratia marcens*

* Gram positivos, como *Arthrobacter y Bacillus: B. cereus,B. subtilis, etc*. Otros microorganismos: *Streptomyces, hongos: Alternaria,, Trichoderma, Aspergillus, Fusarium, Cladosporium,* etc.

* Rápida colonización por: alta velocidad de crecimiento, movilidad que le permita acceder a nutrientes, quimiostasis (desplazamiento hacia exudados radicales)

Mecanismos de acción

1. **Producción de sustancias estimulantes del crecimiento vegetal**. En medios de cultivo se ha verificado la producción de sustancias del tipo de las **fitohormonas**; auxinas, giberelinas, citoquininas. El ácido indol acético (AIA) a bajas concentraciones promueve la elongación radical e incrementa las ramificaciones laterales (**aumenta el área radical**), mientras que mayores concentraciones pueden resultar inhibitorias. Algunos autores relacionan la producción de AIA con aumentos en la permeabilidad celular con consiguiente incremento en la exudación radical. Se han logrado los mismos efectos con la adición de giberelinas o AIA que con la inoculación con diazotrofos, como por ejemplo, *Azospirillum,* evidenciando que el efecto en los incrementos de los rendimientos se deben principalmente a estas sustancias (Fulchieri, 1992).

2. **Incrementos en la capacidad de absorción de agua y minerales.** Los MPCV aumentan la disponibilidad de nutrientes poco móviles (fosfatos) y su absorción por la planta. Los microorganismos solublizadores de fósforo como *Bacillus megaterium, B. fluorescens* son capaces de mineralizar P orgánico (fosfatasas) o solubilizar el P inorgánico por producción de ácidos (capítulos 12 y 16). Los procesos de oxido-reducción ponen a disposición de los vegetales nutrientes solubles asimilables (nitratos, sulfatos, sales ferrosas, etc.) (capítulos 10 y 12).

La inoculación con diazotrofos como *Azospirillum* y la simbiosis con hongos ecto y endomicorríticos producen estos efectos.

3. **Estimulación de la germinación y emergencia**
Se verificó la producción de sustancias de tipo fenoles como las **quinonas** por *Pseudomonas* estimulan la germinación de semillas y la emergencia de plántulas.

Mecanismos de acción indirecta

Control biológico

Los microorganismos deletéreos y fitopatógenos causan serios deterioros en frutas, hortalizas, plantas ornamentales y pérdidas económicas. Ocurren severas enfermedades a nivel de hojas, frutos, tallos, raíces.

Los tratamientos empleados en el control de estas plagas incluyen:

Control químico: innumerables sustancias de gran toxicidad se emplean en el tratamiento de enfermedades vegetales. Se calculan 500.000 toneladas de agrotóxicos usadas en el mundo al año, lo que ha despertado gran inquietud por los efectos laterales contra los animales y el hombre, la lenta biodegradación de muchos y su acumulación en aguas y suelos.

Control biológico: se aprovechan efectos antagonistas de un microorganismo sobre otro para disminuir o eliminar enfermedades, sobretodo a nivel de raíces, y la inoculación de organismos seleccionados resulta una práctica cada vez más extendida a nivel de vivero. Resulta más difícil el tratamiento biológico a nivel de hojas, tallos, etc. Cada día se incrementan las investigaciones en este aspecto, ya que los microorganismos no presentan, en general, el riesgo de toxicidad de los agroquímicos y los costos de aplicación son bajos.

Son muy empleados hongos y bacterias contra **insectos** plaga de vegetales.

Control integrado: práctica que resulta de la interacción de los anteriores, con el empleo de bajas dosis de sustancias químicas combinado con inoculantes biológicos.

Conceptos: existen muchas definiciones del control biológico, pero en **sentido amplio** se considera la reducción de la cantidad de un patógeno o de la actividad que produce enfermedad en un vegetal, mediante el uso de microorganismos, sus enzimas o sus genes. En **sentido más acotado:** se refiere a la introducción artificial de microorganismos antagonistas o sus productos o genes en el ambiente para controlar al patógeno.

Los procedimientos aplicados pueden variar (cuadro 3).

Las ventajas y desventajas del control biológico de enfermedades en vegetales han sido resumidas por Gould (1990) y se presentan en el cuadro 4.

Cuadro 3- Mecanismos de control biológico de enfermedades vegetales

* rotación de cultivos con plantas no susceptibles al patógeno o mantener barbechos (sin cultivos)
* aradas, que aceleran el desplazamiento de algunos patógenos en los residuos
* empleo de variedades resistentes
* tratamiento del suelo (vapor de agua, solarización, biocidas) que cambian la microflora del suelo
* incorporación de *compost* y otros materiales orgánicos que estimulan la actividad de antagonistas naturales o suprimen la actividad del patógeno
* inoculación con microorganismos antagonistas

Cuadro 4- Ventajas y desventajas del control biológico de fitopatógenos

Ventajas

* Los microorganismos ofrecen mayor seguridad en el uso en relación a muchos agentes químicos
* No se acumulan en las cadenas alimenticias
* Su persistencia y multiplicación evita repetidas aplicaciones
* Raramente desarrollan resistencias como ocurre con agentes químicos
* Cuando se muestran menos efectivos que una sustancia química, ambos se pueden combinar en las aplicaciones
* Los agentes biológicos correctamente preparados y aplicados no son considerados peligrosos para la ecología

Desventajas

* La variabilidad genética de muchos microorganismos seleccionados, obligaría a una selección continua
* La experimentación requerida, que incluye ensayos de laboratorio, invernáculo y campo
* Las variaciones en los resultados de aplicaciones de campo (efecto de suelos, clima, etc.)
* La necesidad de asegurar su sobrevivencia en los soportes más empleados en los inoculantes comerciales

La evidencia de control biológico se obtuvo en la década del 80 cuando monocultivos de trigo o cebada infectados con un hongo *Gaeumannomyces graminis* se trataron con un suelo **supresivo** para la enfermedad (*take-all*), es decir un suelo que no permite el desarrollo de este patógeno.

Los suelos **conductivos** (que manifiestan la enfermedad) se convirtieron en **supresivos,** sugiriendo la participación de un factor biológico. En efecto, se encontró mayor número de pseudomonas fluorescentes antagonistas del hongo en la rizosfera de trigo en relación al resto del suelo. Actualmente, numerosas pseudomonas se reconocen efectivas en el control de esta enfermedad.

El control biológico de enfermedades de raíces se puede lograr de varias maneras (cuadro 5).

Cuadro 5- Prácticas de control biológico

* Inoculación directa de las bacterias u hongos seleccionados en semillas o trozos de tallos (propagación vegetativa)
* Incorporación en el suelo del vivero
* Control indirecto por cambios culturales que estimulan a la microflora antagonista nativa
* Control integrado, como inoculación de semillas con el agente de control biológico y dosis menores del agente químico

El cuadro 6 presenta algunas de las características que debe presentar un microorganismo para actuar como un antagonista ideal de un microorganismo fitopatógeno.

Cuadro 6- Cualidades de un antagonista ideal

* Genéticamente estable
* Efectivo a bajas concentraciones
* Poco exigente en requerimientos nutritivos
* Capaz de sobrevivir en condiciones ambientales adversas
* Eficaz contra amplio rango de patógenos
* Posible de cultivo en medios corrientes
* Mantener el efecto en el tiempo
* Que no produzca efectos secundarios
* Resistente a pesticidas
* No ser patógeno para el hospedero

Un microorganismo efectivo en el control biológico deber realizar alguna de funciones presentadas en el cuadro 7.

Cuadro 7- Propiedades de un microorganismo antagonista

* Colonizar rápidamente la zona radical
* Producir antibióticos que antagonicen a los microorganismos patógenos
* Producir compuestos que quelatan al hierro, como los llamados «sideróforos», que hacen menos disponible este elemento para los patógenos
* Competir por sustratos esenciales para el patógeno
* Competir con el patógeno por los sitios de infección
* Liberar nutrientes asimilables por las plantas (N, P, etc.) y producir compuestos promotores del crecimiento de las plantas, como AIA, giberelinas, etc., que favorecen el desarrollo de las plantas
* Moverse hacia zonas adecuadas de la raíz y adherirse a ella
* Emplear los sustratos disponibles
* Competir con la microflora autóctona
* Multiplicarse sobre la raíz

La habilidad de un organismo para colonizar la rizosfera del hospedante es uno de los principales requerimientos para el éxito del control biológico de enfermedades de raíz.

Si se inoculan las semillas, el microorganismo debe multiplicarse en la espermatósfera antes de establecerse en la radícula emergente. La **quimiostasis** ayuda a desplazarse hacia exudados. La adhesión a la raíz mediante unión a glicoporteínas, como las **lectinas,** ha sido reconocida como un paso crítico en la colonización. Los exudados radicales seleccionan poblaciones rizosféricas y varían con el ambiente, la genética y estado de desarrollo de la planta y afectan la susceptibilidad de los cultivos frente a enfermedades (capítulo 13).

Mecanismos en el control biológico

Los antagonismos biológicos se dan por: competencia, amensalismo, predación, parasitismo (Kapulnik, 1991) (capítulo 14).

Competencia

Se da por nutrientes (C, N, S, P, Fe, micronutrientes, etc.), espacio, agua, O_2, CO_2, luz, etc. Una colonización agresiva por estos antagonistas desplaza especies rizosféricas deletéreas disminuyendo el riesgo de reducción del crecimiento vegetal. Se reduce también el inóculo de patógenos del suelo.

Competencia mediada por sideróforos

A pesar de que el hierro es abundante en los suelos, está muchas veces no disponible para plantas y microorganismos ya que su solubilidad es muy baja a pH neutro y alcalino. Muchos microorganismos, sobre todo especies de *Pseudomonas* producen sustancias orgánicas quelantes, de bajo PM (figura 1), con elevada afinidad por el ion férrico, denominados **sideróforos**, que son inducidos por bajas concentraciones de hierro y reprimidos por altas.

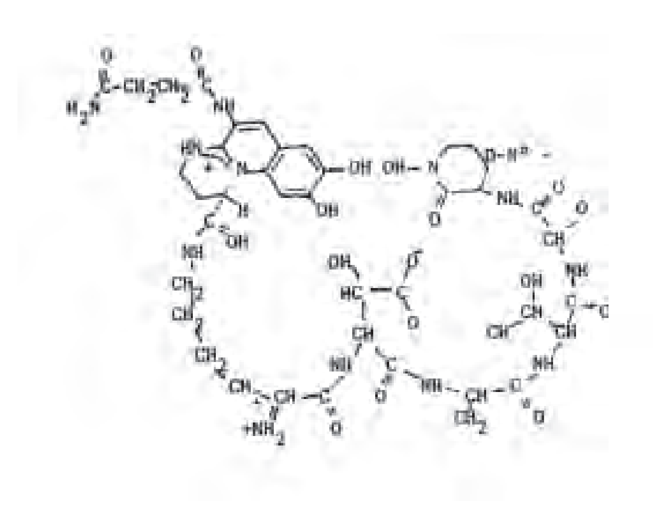


Figura 1- Esquema del sideróforo seudobactina

Estas sustancias favorecen las posibilidades de asimilación de este ión por la bacteria productora en ambientes de baja disponibilidad, compitiendo con el microorganismo deletéreo o patógeno (figura 2).

Los pigmentos fluorescentes que permiten identificar a estas pseudomonas constituyen muchas veces sideróforos, como la **pioverdina, seudobactina**. Una proteína de membrana específica (permeasa) transporta el compelejo organo-metálico al citoplasma, donde sistemas ferrisideróforo-reductasa reducen el hierro y el resultante hierro ferroso es liberado y asimilado por la planta. El sideróforo queda disponible para reiniciar el ciclo.

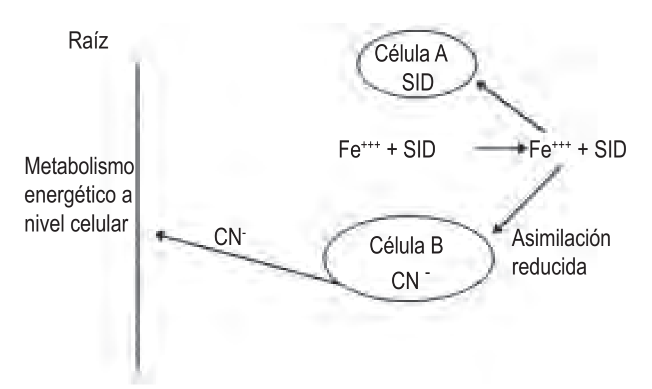


Figura 2- Mecanismo de acción de sideróforos. A-célula productora de sideróforos, B- célula de microorganismo deletéreo productor de cianuro. SID- sideróforo

Muchos microorganismos deletéreos producen **HCN** (ácido cianhídrico) que inhibe el metabolismo energético a nivel de la **CTE** (figura 2). Los microorganismos productores de sideróforos compiten con estos organismos por el hierro, inhibiendo el efecto deletéreo en el cultivo. A pH inferiores a 6,0 el hierro disponible (ferroso) aumenta y los sideróforos son menos efectivos.

Para determinar si la producción de estas sustancias es la causa de la supresión de una enfermedad, se agrega Fe soluble al sistema suelo-planta: si reaparece la enfermedad la competencia por el hierro puede haber sido la causa de la supresión.

Otra forma de demostrar esto es mediante el empleo de mutantes sideróforo negativas (**sid$^-$**) obtenidas con ayuda de transposonos (**Tn5**), su inoculación no limita la enfermedad, pero si lo hace la recombinante con el segmento de ADN productor del sideróforo aislado de la cepa salvaje.

Numerosas bacterias y hongos producen sideróforos, como *Azospirilluam, Rhizobium*, etc. y en la selección de cepas para la preparación de inoculantes se incluye la producción de sideróforos para favorecer su supremacía en ambientes con hierro no disponible. Muchos pigmentos fluorescentes aislados de *Pseudomonas* poseen la propiedad de complejar el hierro e inhibir a hongos fitopatógenos. La inhibición es revertida por el agregado de hierro. La inoculación de estas bacterias y su sideróforo, **pseudobactina**, a suelos conductivos los convierten en supresivos.

Este suelo revierte a su estado original conductivo por:

- la adición de hierro
- al bajar el pH, debido probablemente a una incrementada disponibilidad del hierro a bajos pH

Amensalismo

Uno de los principales mecanismos de control biológico es la producción de metabolitos secundarios tóxicos, como los **antibióticos,** o toxinas específicas como las **bacteriocinas** que actúan sobre hongos patógenos induciendo fungiostasis, inhibiendo la germinación, lisando el micelio o ejerciendo efectos fungicidas. Son moléculas orgánicas liberadas por los microorganismos al ambiente donde pueden perder efectividad a distancia de las células productoras porque son adsorbidas a los coloides orgánicos o minerales o son degradadas química o biológicamente. La aparición de resistencias en los patógenos, codificada en general en **plásmidos**, limita muchas veces su efectividad.

Las pseudomonas fluorescentes han sido consideradas para el control biológico ya que producen gran número de metabolitos secundarios, (figura 3, a y b), muchos con acción antimicrobiana (1 a 5 figura 3a). Otras pseudomonas producen potentes antibióticos (1 a 5, fig 3b) como **tropolone**, bacteriostático y bactericida de amplio rango de bacterias y también fungicida. Producen también HCN.

Algunas pseudomonas han sido patentadas y se emplean en inoculantes comerciales:

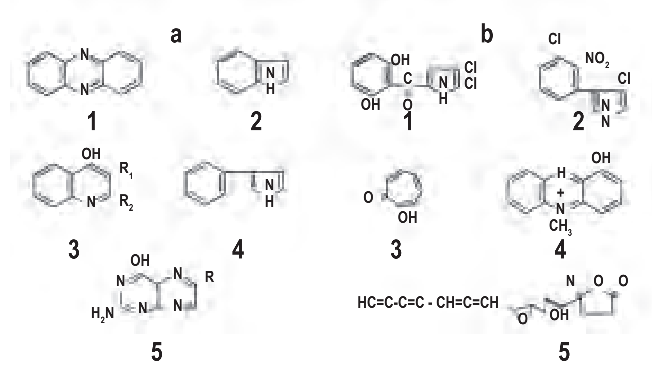


Figura 3- Metabolitos secundarios producidos por pseudomonas fluorescentes

a) 1- fenacinas, 2- indoles, 3- pio compuestos 4-fenilpirroles 5-pterinas b) Antibióticos representativos producidos por pseudomona: 1-pioleuterina, 2-pirrolnitrina, 3-tropolone, 4-piocianina, 5- cepacina A

***Pseudomonas putida* WCS358**, seleccionada para papa que incrementó rendimientos en 13% en el campo. Su efecto es mayor en rotaciones cortas (unos 3 años). Su efecto es la producción de sideróforos limitando el hierro a la microflora deletérea que produce HCN**.**

***Pseudomonas fluorescens* 2-79,** efectiva en maíz con enfermedades producidas por *Gaeumannomyces graminis var tritici,* por sideróforos y antibióticos.

***Pseudomonas fluorescens* CHAO** que produce el sideróforo **pioverdina**, ácido salicílico y tres antibióticos, entre ellos **pioluteorina**

Las condiciones químicas y nutricionales del suelo afectan la producción de los antibióticos: el pH, nutrientes inorgánicos, edad del cultivo. En medios de cultivo se observó que estas sustancias se producen en la segunda mitad de la fase estacionaria, cuando las fuentes minerales se agotan.

La evidencia del rol de estas sustancias en el control biológico se obtuvo a partir de los trabajos de Howell y Stipanovic (1980) quienes aislaron de rizosfera de algodón una cepa de *P. fluorescens* antagonista de de *Rhizoctonia solani y Phythium ultimun,* que produce dos antibióticos: **pioleutorina,** activa contra *P. ultimum* y **pirrolnitrina,** activa contra

R. solani. Esta bacteria inoculada en semillas de algodón lo protegió de la enfermedad conocida como *damping-off* producida por ambos hongos. La aplicación de los antibióticos a las semillas protegió a la planta de esta enfermedad.

Pero la confirmación de este rol se realiza con el empleo de mutantes antibiótico negativas, que no protegen a la planta, mientras que la cepa parenteral si la protege asi como la mutante complementada con el ADN responsable de la síntesis del antibiótico.

Otra clase de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias son las **bacteriocinas**, efectivas contra microorganismos estrechamente relacionados (muchas veces de la misma especie). Uno de las primeras aplicaciones comerciales para el control biológico de enfermedades de raíces ha sido el uso de *Agrobacterium radiobacter K84* para el control de *Agrobacterium tumefaciens* causante de la enfermedad conocida como «agallas de corona», mediante la producción de «**Agrocina 84**», codificada por un plásmido, cuya transferencia a cepas de *A. tumefaciens* las convierte en resistentes.

El cuadro 8 muestra los resultados de un experimento de evaluación del efecto de cepas de pseudomonas sobre hongos fitopatógenos *in-vitro*. Se aprecia que la cepa 374 produce inhibición por varios mecanismos simultáneos además de por sideróforos, mientras que la 429 lo hace por competencia por el hierro, evidenciado por el levantamiento de la inhibición por el agregado del mismo. El cuadro 9 muestra el efecto del Fe en el antagonismo entre bacterias y un hongo. Se vuelve a apreciar la confluencia de más de un mecanismo de antagonismo.

Cuadro 8- Efecto de *Pseudomonas florescens* en el crecimiento de hongos. Inhibición (mm)

	cepa 429		cepa 374	
	-Fe	+Fe	-Fe	+Fe
Botrytis cinerea	2,7	0	15,0	4,0
Cochliobolus sativus	3,8	0	9,5	4,2
C. victoria	6,0	0	4,3	1,0
Fusarium solani	0	0	0	0
Trichoderma hamatum	6,3	0	4,8	3,0
T. harzianum	6,5	0	4,6	1,3

Cuadro 9- Efecto del Fe en el antagonismo que afecta la germinación de clamidosporas de *Fusarium oxysporum*

Antagonista	% germinación	
	-Fe	+Fe
Control	83	94
Pseudomonas 346	10	46
Pseudomonas NIR	15	50
Enterobacter	12	40

El cuadro 10 presenta los resultados de un ensayo sobre actividad antagonista lítica y de antibiosis contra *Rhizoctonia solani* en suelos supresivos y conductivos para este patógeno. Se aprecia que el efecto parece deberse al incremento en hongos totales y entre ellos a un antagonista natural productor de antibióticos.

Cuadro 10- Análisis del efecto antagónico de bacterias y hongos sobre *Rhizoctonia solani* en suelos supresivos y conductivos para el patógeno

Tratamiento	%colonias con inhibición	%colonias líticas	bacterias totales	hongos totales	*Trichoderma* spp
Control	15	56	$9,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
No supresivo	6	57	$2,4 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$	$2,0 \times 10^2$
Supresivo	17	63	$2,7 \times 10^6$	$1,2 \times 10^8$	$4,0 \times 10^4$

Resumen: sobre el control biológico mediado por sideróforos

- control *in vitro* a bajas concentraciones de Fe^{+3} y no en altas
- mayor rendimiento de cultivos en suelos privados de Fe^{+3}
- agregado de pseudobactina al suelo: supresión enfermedades por *Phytium y Gaeumanomyces*
- mutantes no productoras (sid^-) pierden capacidad de supresión de patógenos en la rizosfera

Micoparasitismo

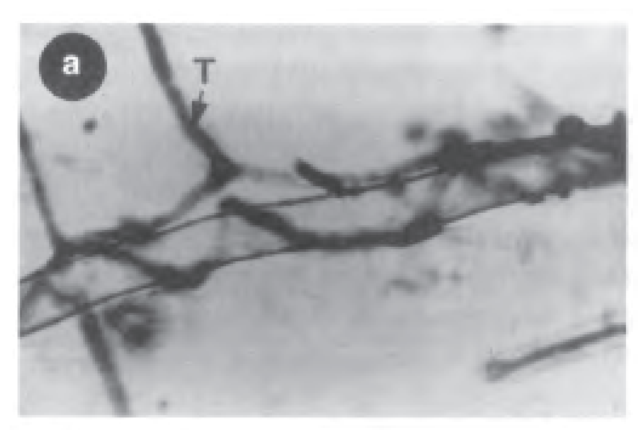
El empleo de hongos como agentes de biocontrol se ha extendido mucho en los últimos años y la literatura es muy amplia sobre resultados de antagonismo de patógenos, sobretodo de otros hongos (Howell, 1990). El grupo de *Hyphomycetes* más empleado en el control biológico lo integran los géneros: *Verticillium, Trichoderma y Gliocladium,* los 3 son micoparásitos necrotróficos (matan inmediatamente del contacto con el hospedante) y buenos saprofitas que crecen en medios corrientes de laboratorio. *V. biguttatum* se encuentra en asociación con esclerocios de *Rhizoctonia solani* y se usa en el tratamiento de semillas de papa, donde reduce significativamente el número de esclerocios patógenos en los nuevos tubérculos.

El género ***Trichoderma*** contiene numerosas especies usadas en el control biológico seleccionadas por su capacidad de micoparasitar a otros hongos. *T. harzianum* es la especie más empleada y el rango de especies sensibles incluye: *Sclerotium rolfsii, Rhizoctonia solani, Phytium aphanidermatum, Alternaria raphani, Fusarium roseum,* patógenos de muchos cultivos, como trigo, algodón. El ataque se realiza envolviendo y penetrando a las hifas y estructuras de resistencia (figura 4)(Graham y Mitchell, 1998). La entrada se logra por orificios en la pared mediante la producción de enzimas como **ß 1-3 glucanasa y quitinasa.** El reconocimiento de las hifas está mediado por lectinas.

Especies de *Trichoderma* producen además **antibióticos y fitoxinas,** por lo que es son considerados importantes agentes de biocontrol. Se han señalado estimulaciones del crecimiento en cultivos inoculados en suelos estériles, lo que evidencia la producción de sustancias del tipo de las fitohormonas. Otras especies incluyen *T. hamatum, T. koningii y T. viridi,* que producen las típicas esporas verdes en medios de cultivo.

Un representante del género *Penicillum, P. vermiculatum* se emplea en biocontrol por combinación de micoparasitismo y producción de antibióticos. *P. frequentans* parasita esclerocios de numerosos hongos.

Las investigaciones sobre las posibilidades de emplear hongos como agentes de biocontrol avanzan rápidamente, aunque las técnicas de manipulación genética en hongos han prosperado menos que en bacterias. La mutagénesis en hongos es un proceso bastante inespecífico y se han realizado avances con la fusión de protoplastos a los efectos de lograr la transferencia de caracteres de interés asociados al biocontrol de una cepa de hongo a otra.



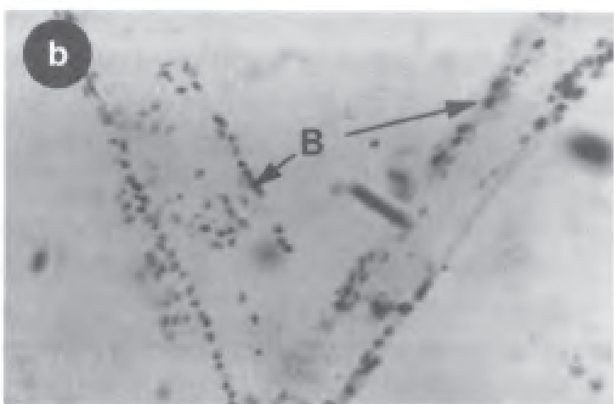


Figura 4- Colonización de *Phytophtora cinnamomi*. a) hifa colonizada por un antagonista, *Trichoderma* sp. (T), b) hifas lisadas con bacteria (B) colonizando la superficie de la hifa

Otros mecanismos

Se han propuesto otras explicaciones de los incrementos en el crecimiento vegetal y la resistencia a enfermedades en plantas inoculadas con microorganismos de biocontrol:

*** enzimas líticas extracelulares** que destruyen la integridad de las paredes de hongos, como **quitinasas**. Se ha demostrado que las hifas de *Sclerotium rolfsii* pueden

ser degradadas tanto por aislamientos de *Serratia marcescens* como por extractos acelulares de la misma cepa con actividad quitinolítica. La adición de quitina al suelo incrementa el número de bacterias y actinomicetes, muchos de ellos inducen quitinasa afectando a la población fúngica.

*** eliminación de microorganismos deletéreos de la rizosfera:** estos organismos inhiben el crecimiento vegetal por producción de metabolitos tóxicos, pero sin llegar a parasitar. Shippers *et al*, 1987) sugieren que uno de los principales grupos de bacterias deletéreas son las pseudomonas productoras de HCN. Como el hierro es necesario para la producción de HCN por estos microorganismos, también sugieren que los microorganismos del inóculo ejercen su efecto benéfico compitiendo con ellos por el hierro.

*** generar resistencia inducida en plantas sensibles:** se ha observado que cepas no patogénicas de un hongo patógeno prevén la infección por la cepa patógena. Se explica este fenómeno por competencia entre ambas cepas por nichos ecológicos similares en el suelo.

*** inhibición de la germinación y crecimiento de hongos** por compuestos volátiles de la atmósfera del suelo, como el etileno, amonio, ha sido ocasionalmente observado.

*** aumento de la disponibilidad de nutrientes y producción de sustancias del tipo de las fitohormonas**, como el AIA, giberelinas, citoquininas, que ha sido verificada en cultivos microbianos, se postula como causa de control de enfermedades. El cultivo se desarrolla más tempranamente y su población rizosférica puede competir con el patógeno.

Desarrollo de agentes para el control biológico

A pesar de los múltiples ejemplos publicados en los últimos años sobre el éxito en la aplicación de organismos para el control biológico de enfermedades de raíces, ha habido escaso desarrollo de formulaciones comerciales. Powell (1993) señala que el mercado de agroquímicos en el mundo es de cerca de 12 mil millones de dólares, de los cuales los agentes de control biológico representan sólo un 1% (120 millones). Pero de éstos, un 92% corresponde a preparaciones secas de *Bacillus thuringensis* (Bt) que sintetizan cristales de proteínas tóxicas en cultivos esporulados y son empleados como poderosos **insecticidas** (figura 5).

El resto está integrado por una mezcla de productos menores.



Figura 5- *Bacillus thuringensis*, bioinsecticida (Bt). Nótese el cristal proteico oscuro vecino a la espora

Para este autor es necesario tener en cuenta una serie de consideraciones para lograr competir con los agentes químicos de control (cuadro 11).

Limitaciones para la comercialización de inoculantes para biocontrol

Los obstáculos principales en el biocontrol por adición al suelo o a las semillas de antagonistas de plagas lo constituye el escaso desarrollo de técnicas de cultivo de gran volumen de biomasa microbiana y la introducción de microorganismos en sistemas de producción en forma segura y de bajo costo.

Se han empleado medios sólidos como arcillas expandidas, residuos de cereales, granos de cebada, para el cul-

tivo de hongos con fines de aplicación masivas, pero no se adaptan bien a las fermentaciones usuales en medio líquido. También se están aplicando soportes orgánicos del tipo alginato de sodio, que encapsulan propágalos de hongos y de *Frankia*, así como bacterias (rhizobios, pseudomonas) en soluciones acuosas de compuestos que forman geles (mezclas de alginato de sodio y cloruro de calcio), ofrecen la facilidad de mantener viables a los inóculos y de ocupar pequeños volúmenes al secarse. En el momento de uso, estos cristales de alginato de calcio, se disuelven con un *buffer* adecuado que se usa como inoculante (Anexo práctico).

Cuadro 11- Consideraciones en el empleo de técnicas de control biológico

* Los agentes de control biológico presentan un espectro estrecho, no sólo en términos de hospedante, sino del ambiente, incluido el pH, tipo de suelo, humedad, temperatura.
* Considerar los costos de selección, producción y formulación de los inoculantes
* Considerar que efectos de laboratorio muchas veces no se reproducen en el campo y se necesitan numerosas experiencias antes de poder recomendar un agente biológico
* Emplear el producto en el sitio de acción (semilla, suelo) resulta crítico, sobretodo en ausencia de movimientos de agua
* Los más efectivos agentes de control biológico son aquellos que poseen un nicho que pueden colonizar rápidamente y sin competencia de la población indígena
* Lograr buen desarrollo en medios simples de laboratorio, de bajo costo, asi como formulaciones sencillas que aseguren viabilidad por períodos de tiempo que permitan su distribución.

La producción de inóculos en fermentadores y su adición a turba (como en el caso de rhizobios) parece ser otra alternativa para estos inoculantes.

Finalmente: se piensa que a pesar del trabajo de selección, propagación y evaluación de efectos de los inoculantes biológicos, su menor impacto en el ambiente los convierte en alternativas promisorias en la lucha contra plagas. Goult (1990) y Campbell (1990) señalan algunas de las líneas futuras de investigación en el tema (cuadro 12).

Cuadro 12- Investigaciones necesarias en el tema de control biológico

* Dilucidación de los mecanismos involucrados en diferentes tipos de suelos
* Identificación de parámetros ambientales que afectan la colonización radical
* Desarrollo de procedimientos más eficientes de selección de cepas y de formulación de productos comerciales
* Identificación de los genes que codifican producción de sideróforos, de antibióticos y los que permiten la colonización de las raíces
* Lograr avances en la modificación genética de cepas para producir agentes superiores de biocontrol, con mayor rango de hospedantes y suelos a ser aplicados

Alternativas a la inoculación

Muchas **prácticas de manejo** conducen al control de microorganismos fitopatógenos por estimulación de la microflora antagonista naturalmente presente, a veces en bajo nivel, en los suelos. Algunos ejemplos de estas prácticas incluyen:

- **rotaciones de cultivos**: el patógeno al no encontrar la rizosfera de la planta sensible (determinada por la naturaleza de exudados) germina y muere al no poder competir con la población nativa por los nutrientes, espacio, etc.

- **incorporación de enmiendas orgánicas**, como pajas, abonos verdes, que provocan una eclosión microbiana en respuesta a los nutrientes aportados por el residuo orgánico. En esta población estimulada se encuentran **antagonistas** que por los mecanismos señalados en este capítulo (antibiosis, competencia, predación, parasitismo), logran disminuir o eliminar a la población deletérea o patógena.

Cuando los antagonistas nativos son escasos o inadecuados, se pueden introducir agentes seleccionados de

biocontrol o sus genes, que puedan mantenerse luego de la aplicación al suelo. Se pueden construir microorganismos rizosféricos competentes mediante ingeniería genética, desarrollados a gran escala y que pueden ser aplicados a partes vegetales subterráneas en ambientes conductivos para su establecimiento, crecimiento y dispersión.

Si los procedimientos anteriores no son eficientes, se procede a la inoculación de semillas repetidamente con cada cultivo.

Si bien la tendencia es la selección, producción y patentamiento de un solo microorganismo por producto comercial, la mezcla de microorganismos puede resultar más eficaz, ya que simulan la microflora natural que actúa en la supresión de una enfermedad. Se usan inoculantes con rhizobio y/o hongos micorrícicos que están acompañados de algún microorganismo de biocontrol, como *Pseudomonas, Bacillus,* etc.

El uso masivo de estos productos depende de los costos de producción, de la estabilidad genética de los agentes empleados, de su eficacia en varios ecosistemas.

El cuadro 13 presenta resultados de aplicación de técnicas de control integrado en el caso de podredumbre blanca causada por *Sclerotium cepivorum,* con un fungicida (Iprodione) y un antagonista *Trichoderma harzianum.* Se aprecia el efecto benéfico de ambas cepas de pseudomonas y la ventaja de aplicar control integrado. Sin embargo, frente a los desafíos de mantener el ambiente libre de biocidas, la elección parece inclinarse por el uso de los agentes biológicos.

Cuadro 13- Control integrado

Tratamiento	% de infección
Ninguno	74
Iprodine	51
T. harzianum cepa T	18
T. harzianum ipro 25M	13
Iprodione + T.h cepa ipro 25M	6

El cuadro 14 resume algunos datos históricos en el uso de los microorganismos como agentes promotores del crecimiento vegetal.

Cuadro 14- Breve historia del uso de microorganismos como promotores del crecimiento vegetal

* 1958 ex URSS inoculación de 10^7 ha con *A. chroococcum y B. megaterium* var. phosphaticum (bajos incrementos)
* 1974 se preparan y comercializan inoculantes en pequeña escala en varios países
* 1978 resultados favorables con *Pseudomonas* (se mantienen y desarrollan en la rizosfera) Kloeper y Schroth: uso de la sigla *PGPR*
* 1986 Schipers obtiene mutante sid^- (Tn5) de *P. fluorescens* WCS 358 que no promueve crecimiento de papas en campo, si lo hace su recombinante sid^+
* Se incrementan los trabajos en bacterias: *P. fluorescens, P. putida. Bacillus, Azospirillum,* hongos: *Thrichoderma, Penicillum, Cladosporium, Gliocladium*
* 1993 mercado agroquímicos en el mundo U$S 12.10^6, agentes biológicos 1% (120 millones de dólares), 92% corresponde a Bt (*Bacillus thuringensis*).

Bibliografía

Campbell, R. Biological Control of Soil-Borne Diseases. En: **Brighton Crop Protection Conference- Pests and Diseases,** 1990, Brighton, Section 7A-2

Fulchieri, M. Producción de giberelinas por *Azospirillum spp.* y efecto de la inoculación sobre el contenido de giberelinas en la raíz y la promoción del crecimiento en maíz (*Zea mays, L).* 1992, Tesis Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Río Cuarto, 170 pp

Graham, J.H. Y Mitchell, D. J. Biological Control of Soilborne Plant Pathogens and Nematodes. En: **Principles and Applications of Soil Microbiology**, 1998, (eds) Sylvia, Fuhrmann, Hartel y Zuberer, Prentice Hall, Ney Jersey: 427-446

Gould, W.D. Biological Control of Plant Root Diseases by Bacteria. En: **Biotecnology of Plant-Microbe Interactions**, 1990, J.P. Naskas y Ch. Hagedorn (eds) Mac Graw-Hill, New York: 287-317

Howell, Ch.R. Fungi as Biological Biocontrol Agents, en **Biotechnology of Plant-Microbe Interactions,** 1990, J.P. Naskas y Ch. Hagedorn (eds) Mac Graw-Hill, New York: 257-286

Howell, C.R. y R. D. Stipanovic, Suppresion of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoleutorin, 1980, Phytopalogy 70: 712-715

Kapulnik, Y. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. En: **Plant Roots, the Hidden Half,** 1991, Waisel, Y., A. Eshel y V. Kafkafi (eds), Marcel Dekker, New York: 717-729

Shippers, B., Bakker, A.W. y P.A.H.M. Bakker Interactions of deleteterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. 1987 Ann. Rev. Phytopatology 25: 339-358

Powell, K.A. The commercial exploitation of microorganisms in agriculture. En: **Exploitation of Microorganisms,** 1993, D.G. Jones(ed), Chapman & Hall, London: 441-459

Preguntas de repaso

1) ¿Cómo afectan las plantas la dinámica del equilibrio entre los microorganismos en el suelo?
2) ¿Qué acciones de los microorganismos pueden afectar negativamente a las plantas? Señale algún ejemplo
3) ¿Qué mecanismos utilizan los microorganismos para limitar poblaciones de patógenos vegetales?
4) Señale procedimientos que le permitan demostrar alguno de esos mecanismos como involucrados en el control biológico de microorganismos fitopatógenos.
5) Características importantes en la competencia rizosférica de microorganismos del suelo?
6) ¿Por qué muchas veces una mezcla de agentes de control puede resultar más efectivo que el uso de un solo microorganismo?
7) Pasos a seguir en la elaboración de un producto biológico a usar para control de una fusariosis en raíz de trigo.
8) Discuta los términos: control químico, control integrado, control biológico

18 Procesos microbianos en el rumen

Los rumiantes constituyen un grupo de animales herbívoros con un estómago dividido en cuatro compartimentos y rumian un bolo alimenticio parcialmente digerido. Ejemplos: el ganado vacuno, ovino y caprino, alces, camellos, ciervos, jirafas y búfalos.

Todos estos animales poseen una porción dilatada en su tubo digestivo donde los alimentos fibrosos voluminosos, que forman gran proporción de su dieta, pueden ser detenidos y sufrir una serie de fermentaciones, que los hacen disponibles para su asimilación (figura 1)(Prescott *et al*, 1999).

La parte superior del estómago se expande para formar una gran bolsa, denominada rumen, y un pequeño retículo o redecilla. La parte inferior del estómago está constituida por una antecámara, el omaso, detrás de la cual se sitúa el verdadero estómago (abomaso). Los polisacáridos insolubles y la celulosa se mezclan con la saliva y pasan al rumen, donde sufren movimiento de rotación constante y forman una masa pulposa que es atacada por una activa población microbiana (10^{12} bacterias/mL). Luego el alimento pasa al retículo y de allí es regurgitado en forma de «bolo alimenticio» que el animal rumia. El alimento se mezcla con saliva, se traga de nuevo y vuelve al rumen al tiempo que llega otro bolo a la boca. En estas etapas el material va siendo digerido y se hace más líquido.

Este material pasa entonces al retículo y de allí a la parte inferior del estómago: al omaso y luego al abomaso (estómago verdadero) donde el alimento es atacado por las enzimas digestivas normales del animal y el proceso de digestión continúa en forma similar al resto de los mamíferos.

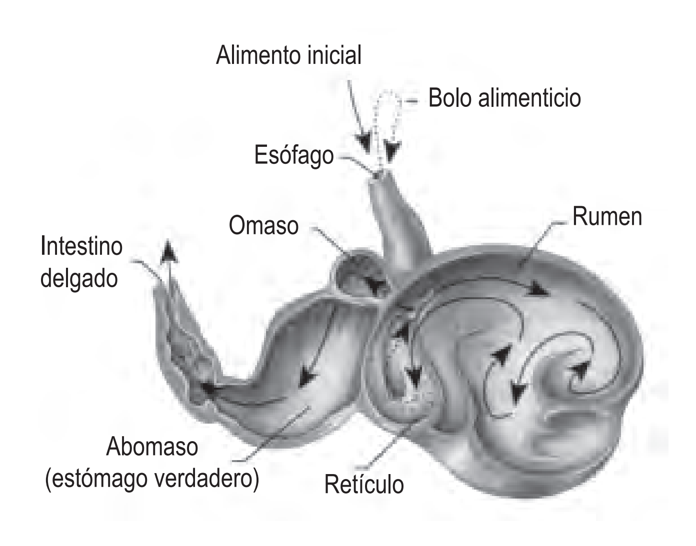


Figura 1- Estómago de un rumiante. Las flechas señalan la dirección del alimento

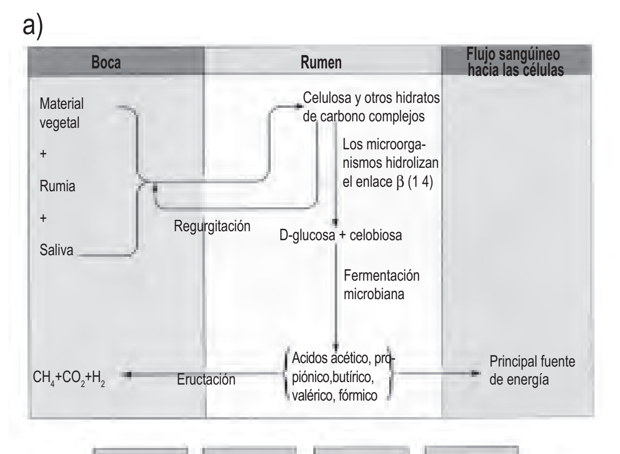
Estos animales aprovechan la acción de los microorganismos que habitan su tracto gastrointestinal y que son los principales agentes de la degradación de las paredes gruesas de los vegetales y permiten la asimilación de hidratos de carbono complejos ingeridos por el animal.

Como los rumiantes no pueden sintetizar celulasas, aprovechan las relaciones simbióticas con microorganismos anaerobios que las poseen.

El rumen es un ecosistema microbiano complejo, donde coexisten relaciones simbióticas entre el animal y las poblaciones microbianas. Los alimentos ingeridos son fermentados y los productos finales son ácidos grasos volá-

tiles (AGV) y fuentes de energía para el animal (figura 2)(Prescott *et al.*, 1999).

a)



b)

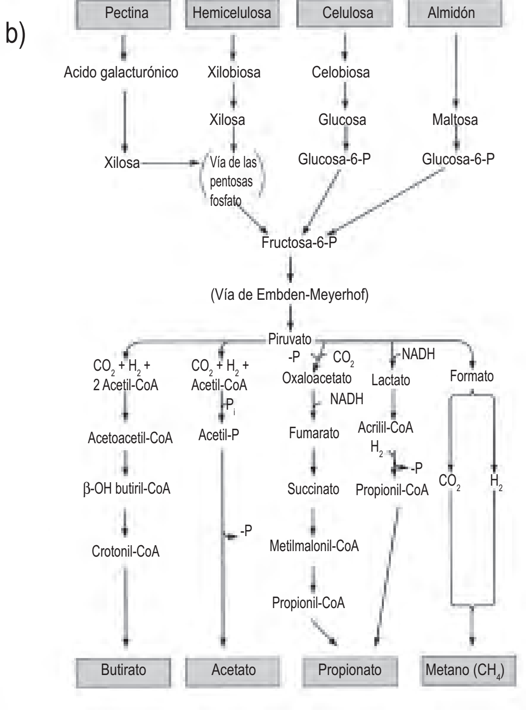


Figura 2- Bioquímica del rumen

a) Procesos bioquímicos y fisiológicos en el aparato digestivo de un rumiante
b) Fermentaciones ruminales de los principales polisacáridos ingeridos y sus productos finales

El pH se mantiene en estado de equilibrio por tampones de la saliva y por la absorción de los AGV.

Se produce biomasa microbiana rica en proteínas, hidratos de carbono y lípidos que son usados por el animal. El sistema presenta un rango de potencial de oxido-reducción entre–250 a –450 mV. Los rangos de temperatura varían entre 38 y 42 Cº

El balance de microorganismos en el rumen es regulado por las condiciones del ambiente en el mismo (incluyendo el sustrato) y se considera un sistema continuo.

El rumen ha sido comparado a un fermentador: su temperatura y estado anaerobio son estables, las fluctuaciones de pH son limitados. Pero se diferencia de un dispositivo industrial en que la composición química y la estructura de los sustratos ingeridos, varían amplia y rápidamente.

El rumen, es en esencia, un sistema anaerobio muy reductor, un medio ligeramente ácido, de pH fijo, isotérmico, con una temperatura de unos 39ºC y con una fase gaseosa compuesta principalmente de CO_2, metano y nitrógeno. El pH se mantiene relativamente constante (6-7) por la absorción de de los ácidos grasos por la pared del rumen o por neutralización por sistemas tampones de la saliva.

El objetivo de una dieta diaria balanceada para el ganado es proveer un ambiente en el rumen que maximice la producción microbiana y el crecimiento. Cuando se diseñan raciones para rumiantes es necesario tener en cuenta a los microorganismos tanto del animal como los del rumen.

Los microorganismos que colonizan a los jóvenes animales por la ingesta, saliva, aire, heces son estrictamente anaerobios, aunque algo de O_2 es tolerado y si la fermentación es activa el Eh se mantiene en límites normales (-250 a -450mV).

Las enzimas para la fermentación son provistas por un significativo número de especies de bacterias, hongos y protozoos y el número relativo de las distintas especies varía con la composición y estructura del alimento. Por otra parte, las interacciones biológicas que se dan entre ellas son altamente complejas.

La proliferación continua de los microorganismos está asegurada por la ingestión periódica de los alimentos y el

flujo continuo de saliva, el paso del contenido a lo largo del tracto digestivo y por la absorción de los productos finales del metabolismo a través de la pared del rumen. La muerte y autolisis de microorganismos asegura el desarrollo de otros microorganismos que se nutren de los productos liberados (canibalismo).

En general, los organismos sobreviven en este ecosistema si su tiempo de generación es menor que el tiempo de retención en este órgano. Muchos microorganismos pueden sobrevivir en situaciones de rápido tránsito por adhesión a las paredes o a partículas grandes de alimentos.

Generalmente, las especies dominantes en el rumen convierten la energía del sustrato en biomasa, resultando en menor formación de ácidos por unidad de sustrato. La selección natural también favorece el máximo trabajo bioquímico, en general en relación inversa al tamaño celular.

Si bien la proporción de los productos finales varía, ellos consisten principalmente en: CO_2, CH_4 y tres ácidos grasos volátiles (AGV): acético, propiónico y butítrico, junto a amonio, trazas de otros ácidos grasos y algunas veces, ácido láctico.

Microorganismos anaerobios con adaptaciones ecológicas y requerimientos nutritivos similares existen en los silos, aguas servidas, en la biodegradación anaerobia de restos orgánicos. La diferencia más marcada es que en la biodegradación anaerobia en silos o aguas el tiempo de retención es mayor, con más eficiencia en la extracción de la energía del sustrato y proliferación de bacterias metanogénicas que poseen un tiempo de generación mayor (4 días) que el tiempo de retención de los sustratos. El resultado es que en estos ambientes no se acumulan ácidos grasos y los productos se degradan a CH_4 y CO_2 (capítulo 21).

La biología y ecología de esta población microbiana es muy similar en la mayoría de las especies animales. La selección de especies y la adaptación de las poblaciones microbianas están determinadas más por la dieta y el tiempo de retención que por el huésped, sea éste rumiante o no-rumiante.

Metodología de estudio

Se han empleado numerosas técnicas para estos estudios.

Suspensiones lavadas: un gran volumen de contenido ruminal se filtra por tela y luego se centrifuga primero lentamente para eliminar los protozoos grandes y luego a mayor velocidad por 30´ y se incuba con solución de fosfatos para regular el pH, en anaerobiosis con el sustrato a analizar. Se siguen procesos como la decarboxilación del ácido succínico y la reducción de los nitratos. Se aprecia generalmente correlación con los resultados obtenidos *in-vivo*. Esta técnica constituye un medio útil para estudiar con detalle las propiedades de la flora mixta del rumen luego de la eliminación de complicaciones como la absorción a partículas y la presencia de varios sustratos.

Rumen artificial: existen numerosos dispositivos para realizar los estudios *in-vitro* que tienden a similar las condiciones físico-químicas y ambientales del rumen natural. Estos se perfeccionan de modo de analizar efectos de poblaciones microbianas, condiciones vinculadas a la nutrición y factores ambientales. Constituyen verdaderos reactores con controles de entrada y salida de metabolitos, regulación de condiciones de incubación, como temperatura, pH, presión osmótica, etc. y permiten estudiar la degradación de diferentes sustancias por poblaciones microbianas solas o asociadas.

Aislamiento y cultivo de microorganismos del rumen
La mayor dificultad en estos estudios radica en el mantenimiento de las condiciones de anaerobiosis durante el muestreo, siembra y cultivo de los microorganismos, muchos de los cuales viven asociados entre si, lo que dificulta su aislamiento.

Muestro y cultivo

El contenido ruminal se obtiene por succión luego de efectuar una homogeneización manual y después de una agitación suave bajo CO_2 , se filtra por gasa y se liberan las células adheridas a las partículas (0,1% de Tween 80, con 6-8 horas a 0º, o 0,1% de metilcelulosa). Se efectúan suspensiones-diluciones decimales en diluyente en anae-

robiosis las que se inoculan e incuban en los medios escogidos para efectuar el recuento de bacterias, manteniendo siempre la anaerobiosis.

Se usan diferentes cámaras de incubación con atmósfera controlada, en general con suficiente CO_2, que mantiene el pH a niveles adecuados y es empleado por numerosas bacterias. Se usa también una mezcla con 95% de CO_2 y 5% de H_2.

Se emplean medios no selectivos para recuento, aislamiento y mantenimiento de bacterias del rumen. Los recuentos se hacen en tubos con medio sólido, previamente fundido a 45ºC antes de inocular, girado sobre las paredes hasta que el agar solidifica (*roll-tubes*). Las colonias quedan incluidas en el agar, a lo largo del tubo.

Además de los medios no selectivos, se emplean gran número de medios selectivos, que permiten evaluar grupos particulares, como amilolíticos, pectinolíticos, lipolíticos, metanogénicos.

Población microbiana del rumen

La población microbiana del rumen consiste en bacterias, protozoos y hongos. La mayoría de la población microbiana son bacterias cuyo número alcanza 10^{10} a 10^{11} bacterias/g de contenido ruminal. El balance entre los tres tipos principales de microorganismos y el equilibrio de especies en cada grupo está también regulada por las condiciones ambientales en el rumen, incluyendo los sustratos aportados por la dieta.

Las bacterias pueden agruparse de acuerdo a sus formas típicas (cocos, bacilos, espirilos), por su tamaño (generalmente desde 0,3 a 50micras) y por sus estructuras. También pueden agruparse según el tipo de sustrato que fermentan.

Las especies presentes en el rumen degradan o utilizan productos tales como celulosa, hemicelulosas, almidón, azúcares, proteínas, ácidos orgánicos intermediarios, lípidos y producen metano. Una clasificación más extendida puede incluir degradadores de la pectina y productoras de amonio. La mayoría de las especies bacterianas del rumen pueden fermentar más de un sustrato.

Las bacterias productoras de metano constituyen un grupo muy particular responsables de regular todos los procesos de fermentación en el rumen. Remueven el gas H_2 al reducir el CO_2 con el H_2 para dar metano. La producción de metano mantiene la concentración de H_2 baja, lo que permite a las bacterias metanogénicas promover el crecimiento de otras especies bacterianas y una más eficiente fermentación. También la remoción de H_2 favorece a especies productoras de H_2 aumentando los rendimientos en biomasa con el resultado de mayor síntesis de células microbianas, e incremento de proteínas disponibles para el rumiante.

Los protozoos en el rumen oscilan entre 10^5 a 10^6 / gramo de rumen y son afectados por la alimentación. Altos números de protozoos son generalmente encontrados en el rumen con dietas de alta digestibilidad. Diferencias en la composición de la dieta estimulan a distintos géneros de protozoos. Algunas géneros incrementan con dietas con grandes cantidades de azúcares solubles y otros géneros predominan con dietas de alto nivel de almidón.

Los protozoos ingieren bacterias como fuente de proteínas. Ellos también aparecen como estabilizadores de productos finales de la fermentación. Los protozoos, como las bacterias y los hongos contribuyen a la digestión de las fibras. Mientras que los protozoos son parte integral de la población microbiana del rumen y ejercen marcado efecto en la fermentación, su beneficio al rumiante es aun controvertido.

Los hongos anaerobios constituyen el grupo más recientemente reconocido de microorganismos del rumen. Cuando los animales se nutren con dieta rica en forrajes, los hongos del rumen pueden contribuir con más del 8% de la biomasa microbiana. Aunque no esté claro si estos hongos son funcionalmente significativos, se ha mostrado que pueden degradar celulosa y xilanos, indicando rol en la digestión de fibras.

Existen tres ambientes interconectados en el rumen donde se localizan los microorganismos. La primera es la fase

líquida, el fluido ruminal, donde grupos de microorganismos se encuentran libres, se nutren de proteínas y carbohidratos solubles. Esta porción constituye un 25% de la biomasa microbiana.

Luego se encuentra la fase sólida, donde los grupos microbianos asociados o adheridos a partículas alimenticias digieren polisacáridos insolubles, como almidón o fibras, así como a las proteínas menos solubles. Constituyen más del 70% de la biomasa microbiana.

En la última fase, un 5% de los microorganismos están adheridos al epitelio del rumen o a los protozoos.

La adhesión de la microflora al rumen tiene importancia para el rumiante. Para que las bacterias mantengan su número en el rumen, es necesario que su tiempo de generación sea menor que el tiempo de reciclado de la ingesta del rumen. Como la velocidad de pasaje de los nutrientes por la fase particulada es mucho más lenta que la de la fase líquida, las especies que se adhieren a los materiales sólidos, son especies de crecimiento lento, y así, se evita su lavado fuera del rumen.

La composición de la dieta afecta el número y las proporciones relativas de las diferentes especies microbianas en el rumen. La mayoría de los cambios en la dieta requieren un período de transición para permitir incrementar diferentes especies microbianas, periodo que puede durar varios días. Cuando se incluyen grandes cantidades de hidratos de carbono fácilmente fermentables, ocurren varios cambios en la población microbiana, con predominio de aquellos que producen y utilizan lactato.

Los microorganismos productores de lactato, sensibles a la acidez, son remplazadas por consumidores de lactato, ácido tolerantes. Se puede producir una acidosis láctica por este cambio brusco a una dieta rica en concentrados. Se mantiene entonces alta la población que usa lactato para evitar su excesiva acumulación, lo que provoca descenso del pH del rumen a niveles muy ácidos, menores de 5,5.

El pH del rumen es uno de los factores que afectan las poblaciones microbianas y los niveles de ácidos grasos volátiles. El pH del rumen en el cual ciertas funciones son optimizadas, puede variar. Los microorganismos que degradan fibras son más activos a pH 6.2 a 6.8. Las bacterias celulolíticas y metanogénicas pueden reducirse cuando el pH baja debajo de 6,0. Los degradadores del almidón prefieren un pH más ácido de 5.2 a 6.0. Ciertos protozoos pueden deprimirse con pH debajo de 5.5. Para satisfacer estas demandas, las dietas normales deben mantener rangos de pH entre 5.8 a 6.4.

El cuadro 1 (van Soest, 1994) presenta los organismos descriptos en el rumen. Las bacterias pequeñas constituyen la mitad de la biomasa en rumen normal, pero son responsables de la mayor actividad metabólica (generalmente en relación inversa al tamaño celular).

Cuadro 1. Número y volumen relativo de microorganismos en el rumen

Grupo	**Nº/mL**	**Vol celular ($\mu 3$)**	**Biomasa (mg/100mL)**	**tg**	**% de la biomasa total**
Bacterias pequeñas	$1x10^{10}$	1	1.600	20min	60-90
Selenomonas	$1x10^{8}$	30	300		
Oscillospira flagellates	$1x10^{6}$	250	25		
Protozoos,ciliados					10-40
Entodinia	$3x10^{5}$	$1x10^{4}$	300	8h	
Dashytricha + Diplodinia	$3x10^{4}$	$1x10^{5}$	300		
Isotricha + Epidinia	$1x10^{4}$	$1x10^{6}$	1100	36h	
Isotricha + Epidinia	$1x10^{4}$	$1x10^{5}$		24h	5-10

Bacterias en el rumen

Las bacterias del rumen son integrantes de un consorcio que realiza varias funciones vitales para el desarrollo del huésped:

1) Las fibras y otros restos de polímeros vegetales no degradados por enzimas del animal, son fermentados a ácidos grasos volátiles, CO_2 y CH_4. Los AGV pasan las paredes del rumen hacia el sistema circulatorio y son oxidados en el hígado, constituyendo la mayor parte de la energía requerida por el huésped (figura 1). También se usan en la síntesis de materiales celulares.

2) La fermentación está acoplada al crecimiento microbiano y las proteínas de la biomasa constituyen la principal fuente de nitrógeno para el animal.

3) Los microorganismos del rumen sintetizan vitaminas, sobretodo del complejo B, empleadas por el huésped.

4) Algunas bacterias degradan componentes tóxicos de la dieta. Ejemplo son los aminoácidos mimosina y sus derivados, componentes del forraje de *Leucaena*, fenoles vegetales, como la cumarina (1,2 benzopirona), la canavanina, análoga de la arginina, componente de la leguminosa *Canavalia ensiformis*, que inhibe a algunas bacterias del rumen, pero es hidrolizada por otras.

Representan la clase predominante de microorganismos: 1.10^{10} a 10^{11} /g de contenido ruminal.

Probablemente actúen más de 200 especies, pero sólo unas pocas parecen tener significado cuantitativo. Las nuevas técnicas de biología molecular que emplean sondas génicas han hecho cambiar rápidamente la identificación de las bacterias ruminales Se han informado de 22 géneros y 63 especies.

La mayoría son anaerobios obligados, pero coexisten las anaerobias facultativas que pueden representar un 10^7 to 10^8 por gramo de contenido ruminal, adheridas a las paredes del rumen y usan el O_2 que difunde del torrente circulatorio. Son más fáciles de aislar, aunque no son importantes en las funciones del rumen, pero se hacen dominantes en disfunciones de este sistema. Las más importantes son las que fermentan la celulosa.

Las actividades bioquímicas de las bacterias del rumen han sido estudiadas con cierto detalle. Los estudios *in-vivo* brindan información sobre el tipo de fermentación dominante, pero no sobre las actividades de cada especie. El examen microscópico directo del contenido ruminal proporciona considerable información, pero poca sobre las actividades de los microorganismos.

Microorganismos que emplean productos liberados por otros pueden representar más del 60% del número de especies y constituyen un importante grupo funcional. Productos liberados en cultivo puro no han sido detectados en el rumen: como etanol, succinato y formiato, debido al metabolismo compartido, relaciones sintróficas.

El concepto de sintrofia difiere del de simbiosis, en que más de 2 especies están involucradas y el beneficio mutuo se relaciona a las fuentes nutritivas de energía. Los grupos sintróficos relacionados a la degradación de fibras, incluye, por ejemplo, a los celulolíticos, hemicelulolíticos y microorganismos que los suceden, como las bacterias metanogénicas. Las más competitivas presentan adhesión al sustrato y almacenamiento efectivo de la energía dentro de la célula.

Las bacterias ruminales son muchas veces clasificadas por el empleo de distintos sustratos y por los productos finales de su metabolismo.

Las Eubacterias del rumen se caracterizan en base a: morfología y Gram, productos de la fermentación, rango de sustratos usados, relación molar (G+C)% de su ADN y en menor grado por la composición de ácidos grasos en los fosfolípidos.

El cuadro 2 presenta las características de bacterias Gram negativas y Gram positivas del rumen (Stewart, 1991).

Las bacterias pequeñas constituyen más de la mitad de la biomasa y son muy activas: digieren hidratos de carbono: celulosa, hemicelulosa, pectina, almidón y azúcares. Otras emplean celulodextrinas, pentosas, glucosa, lactato, succinato, formiato, H_2, como fuentes de energía.

Veillonela parvula, por ejemplo, crece principalmente en lactato y *Anaerovibrio* en glicerol (liberado de los lípidos por

lipasas) y fructosa. Las celulolíticas, como *Ruminococcus* y *Fibrobacter* crecen sobretodo en celulosa, aunque muchas especies hidrolizan hemicelulosas, pero en general no emplean los productos de la hidrólisis. *Bacteroidamylophilus* degrada almidón y azúcares derivados del almidón.

Bacterias versátiles incluyen *Butyrivibrio*, algunas de cuyas especies son celulolíticas, *Bacteroides ruminicola* y *Selenomonas. Clostridium polysaccharolyticum* es uno de las pocas bacterias del rumen capaces de emplear celulosa y almidón como sustratos.

Cuadro 2 Algunas bacterias G^+ y G^- del rumen

Especie	Morfología	(G+C)%	Productos	Sustratos
Gram positivas				
Bacteroides ruminicola	bacilo	49-50	AS	amplio: hidrol.proteinas
Ruminobacte amylophilus	«	40.42	FAS	almidón
Fibrobacter succinogenes	«	47-49	AS	celulosa
Selenomonas ruminantium	variada	54	LPA	amplio
Butyrivibrio fibrisolvens	bacilo curvo	36-41	FBA	FBA
Anaerovibrio lipolytica	bacilo	ND	PSA	lipolítico
Veillonella parvula	Cocos	38-41	AP H_2	lactato
Succinimonas amylolytica	cocos	ND	S	Almidón
Gram negativas				
Ruminococcus albus	cocos	42-46	A H_2 CO_2	celulosa
R. flavefaciens	cocos	39-44	AS H_2	celulosa
Streptococcus bovis	cocos	37-39	L CO_2	almidón
Lachnospira multiparus	bacilos	ND	FAL H_2 CO_2	pectina
Eubacterium riminantium	bacilos	ND	FBL CO_2	xilano
E. oxidoreducens	bacilos	36	L H_2	aromáticos ?
Lactobacillus ruminis	bacilos	44-47	L	azúcares
L. vitulinus	bacilos	34-37	L	azúcares
Clostridium polysaccharolyticum	bacilos (esporas)	ND	FBA H_2	celulosa/almidón

F=formiato; A=acetato; P=propionato; B=butirato; V=valerato;
S= succinato; L= lactosa; ND= no determinado

Bacterias celulolíticas

La degradación de la celulosa es definida usualmente como la principal función del rumen. Las enzimas responsables de la degradación de la celulosa la presentan principalmente en bacterias. Los vertebrados carecen de estas enzimas. Principales especies:

a) *Fibrobacter succinogenes* - bacilos o cocos Gram$^-$

b) *Ruminococcus albus* - cocos Gram$^+$

c) *Ruminococcus flavefaciens* – cocos Gram$^+$

Las tres especies degradan celulosa a velocidad constante sobre la superficie de las fibras, decrecen por la predación por los protozoos, presentan especificidad de sustratos, usan celulosa o sus productos de hidrólisis.

Forman una cubierta extracelular que les permite adhesión a la celulosa. Las enzimas se localizan cerca o en la superficie del organismo, lo que probablemente disminuye la pérdida de celulasas por proteolisis. Como resultado, la actividad celulolítica del fluido ruminal es mínima. Su desarrollo sigue una cinética de primer orden, dependiendo de la disponibilidad de sustrato, más probablemente de la disponibilidad de la celulosa. Producen primariamente succinato y acetato como productos finales de la fermentación

Las tres especies son anaerobias estrictas y presentan un estrecho rango de pH para su crecimiento -pH 6 a 7-. Requieren ciertos AGV de cadena ramificada para su crecimiento. En cultivos mixtos, estos son aportados por bacterias que fermentan aminoácidos

Muchas de las especies celulolíticas pueden también degradar la fracción mal llamada hemicelulosa.

En medios de cultivo, las bacterias producen metabolitos diferentes que en el rumen, ya que allí las bacterias están asociadas y los productos finales de una son empleados por otras. Así, *B. succinogenes* libera succinato a partir de celulosa, pero *in vivo*, éste es convertido por otras especies en propionato, uno de los principales productos de la fermentación.

Las bacterias celulolíticas colonizan la superficie de restos vegetales en los 5 minutos de su entrada al rumen. Como existe amonio, ellas se multiplican rápidamente. El agregado de urea al alimento, favorece esta multiplicación. Sin embargo, si el pH del rumen cae debajo de 6,0, el crecimiento de las bacterias y la celulolisis se hacen más lentas. Debajo de 5,6 su desarrollo cesa, de modo que la presencia en la dieta de productos que favorecen la acidez, inhiben la digestión de materiales fibrosos. Disminuyen también en presencia de sustratos competitivos, como el almidón.

Principales bacterias xilanolíticas

a) *Butyrivibrio fibrisolvens* – bacilos curvos Gram positivos. Los ácidos butírico, fórmico, acético y láctico son los principales productos finales de la fermentación

b) *Prevotella ruminicola* (formalmente *Bacteroides ruminicola*) – bacilos Gram negativos. Los ácidos succínico, acético y fórmico son los principales productos finales

Se conoce menos sobre la biodegradación de los xilanos en relación con la celulosa.

Bacterias amilolíticas

La mayoría de las bacterias amilolíticas son incapaces de usar celulosa. Las enzimas amilolíticas están muy distribuidas entre las bacterias y son ellas la que aseguran la conversión de materiales amiláceos, como granos de cereales, en ácidos grasos volátiles.

Con amonio, el proceso es más eficiente. Asi, *Streptococcus bovis* produce acetato y etanol cuando se multiplica lentamente, pero forma lactato si crece rápidamente. Esta especie es más tolerante a la acidez que la mayoría de las bacterias del rumen. No son muy abundantes, pero se hacen dominantes si la acumulación de ácido láctico sobrepasa la capacidad tampón del rumen. Severa acidosis (pH 5,0) puede ocurrir cuando la dieta se cambia abruptamente de celulosa a almidón o sacarosa.

La microflora que convierte lactato en acetato y propionato no está presente en número suficiente o se multi-

plica más lentamente que el *S. bovis* y es inhibida cuando el pH cae.

Las enzimas para la degradación del almidón están ampliamente distribuidas entre bacterias, protozoos y hongos. Principales especies:

a) *Bacteroides amylophilus* - bacilos y formas cocoides, Gram$^-$

b) *Streptococcus bovis* - cocos Gram$^+$

c) *Selenomonas ruminantium* – bacilos Gram negativos
Pueden representar entre el 22 al 51% del total de los recuentos de viables. El principal sustrato es el almidón pero pueden usar lactato. La actividad α-amilasa está presente en algunas especies (ej. *B. bovis*), pero no parecen atacar directamente al almidón. Algunas especies (ej. *B. amylophilus*) atacan gránulos de almidón y parecen tener una α-amilasa intracelular.

Principales bacterias proteolíticas

El catabolismo de proteínas y aminoácidos que libera amonio en el rumen es de gran interés en la nutrición del animal, aunque su exceso puede ocasionar problemas. El amonio es también requerido por microorganismos fermentadores, algunos de los cuales pueden también usar aminoácidos o péptidos.

Las proteinas de la microflora constituyen la fuente primaria de N para el animal.
La mayoría de las proteínas contenidas en la dieta son rápidamente hidrolizadas en el rumen. Parte de los aminoácidos son inmovilizados por bacterias y protozoos, los restantes son fuente de energía y son degradadas a AGV y amonio. El exceso de amonio es absorbido por el animal y convertido en urea en el hígado.

La actividad proteolítica está ampliamente distribuida entre los microorganismos del rumen, se ha detectado en más del 38% de los aislamientos a partir de rumen de ganado vacuno. La degradación de aminoácidos parece ser más especializada.

Especies recientemente identificadas:
(a) *Peptostreptococcus anaerobius, Clostridium sticklandii, y Clostridium aminophilum*

Son fermentadoras rápidos de aminoácidos a amonio. La proteolisis y la fermentación de aminoácidos son importantes fuentes de AGV de cadena ramificada para especies celulolíticas y proveen de amonio para especies que lo prefieren como fuente de N.

Las bacterias se adhieren a la pared del rumen y pueden jugar rol en la hidrólisis de la urea.

Muchas de esas especies son anaerobias facultativas.

Organismos Gram negativos del fluido ruminal pueden colonizar la pared del rumen. Las colonias de la pared ruminal invaden áreas dañadas, accediendo a la vena porta, con formación de abcesos en el hígado.

Bacterias metanogénicas

El mecanismo primario de producción de metano en el rumen es la reducción del CO_2.

Se función es mantener baja la concentración de hidrógeno en el rumen, lo que facilita un crecimiento más eficiente de otras bacterias del rumen. Los organismos metanogénicos predominantes son generalmente bacilos Gram positivos.

Methanobrevibacter ruminantium, Methanobacterium formicicum y Methanomicrobium mobile.

Este grupo puede producir más de 200 litros de CH_4 por día en una vaca de 500 kg. Este gas es expelido, en parte con el CO_2 por el animal. Condiciones que restringen la metanogénesis favorecen la producción de propionato e incrementan la relación propionato/acetato en los productos finales de la fermentación.

La metanogénesis promueve la síntesis de ATP, el crecimiento microbiano y la producción de acetato, con la pérdida de más de 15% de la energía del alimento, como metano.

Bacterias hidrolíticas

Oligosacáridos y azúcares solubles, productos finales de la degradación de la celulosa, son empleados por numerosos microorganismos que los degradan obteniendo energía, de modo que la biomasa crece rápidamente. Se forma ATP, poder reductor (NADH) y ferredoxina reducida, que se reciclan por oxidación con liberación de H_2, que puede inhibir a las enzimas responsables. Otros mecanismos biosintéticos ocurren, con producción de propionato y butirato, pero esta diversificación puede limitarse en el rumen por las bacterias metanogénicas ($CO_2 + H_2 = CH_4$).

Otras fuentes de energía

Lípidos

Sólo bajos niveles de lípidos (7%) son adecuados en la dieta del rumiante. A niveles más altos, la liberación de ácidos grasos por su hidrólisis inhibe la digestión de las fibras, posiblemente por recubrimiento superficial de las partículas que limita la adhesión bacteriana. Algunas bacterias convierten el glicerol liberado en AGV, otras hidrogenan ácidos no saturados convirtiéndolos en saturados

Acidos grasos volátiles

En el rumen existen bacterias que usan AGV, pero como ellos son rápidamente asimilados por el animal, su número permanece bajo. Entonces, de los productos finales de la fermentación del rumen:

a) los AGV son metabolizados sólo por microorganismos que no prosperan en el ambiente del rumen,

b) el CO_2 se produce más rápido que lo que se usa y constituye (dependiendo del tipo de fermentación) cerca de 65% de los gases expelidos por el animal y

c) el metano, que constituye el resto del 35%, no puede aportar energía a los microorganismos en las condiciones anaerobias del rumen.

Hongos del rumen

El aporte de hongos *Phycomycetes* en las fermentaciones del rumen ha sido reconocido recientemente y pueden constituir hasta el 8% de la biomasa intra-ruminal. Los flagelados, con sus zoosporas móviles, se confundieron mucho tiempo con protozoos y colonizan regiones dañadas de los tejidos vegetales en las 2 horas de la ingestión en respuesta a materiales solubles. En las 22 horas más del 30% de las partículas mayores se aprecian invadidas por rizoides.

En cultivo puro algunos de estos hongos fermentan celulosa, liberando acetato, lactato, CO_2 e H_2. La celulasa liberada al medio incrementa la degradación. Hemicelulosas, xilanos, almidón y azúcares son también fermentados. La lignina no parece ser degradada por los hongos anaerobios del rumen.

Su principal rol parece relacionado a facilitar la desaparición de la pared celular.

Las principales especies descriptas son:
Neocallimastix frontalis, *Sphaeromonas communis*, y *Pyromonas communis.*

Parecen importantes en dietas con alto contenido de forrajes, pero en general su contribución a la digestión no está aún bien definida. Atacan residuos vegetales y pueden degradar celulosa y xilanos. Su rol en la digestión de fibras parece ser relativamente menor que la de las bacterias

Han sido identificadas especies de 4 géneros: *Neocallimastix*, *Caecomyces* (formalmente *Sphaeromona*), *Pyromyces* (formalmente Phyromonas) y *Orpinomyces* (*Theodorou et al.*, 1992). Resultan más fáciles de cultivar que los protozoos y su ciclo de vida involucra un cuerpo de fructificación (esporangio), originado a partir de una zoospora móvil que se adhiere a las fibras y desarrolla esporangios y filamentos rizoidales, que penetran la matriz lignocelulósica, donde actúan las enzimas.

Los hongos liberan un complejo celulósico más soluble que el de las bacterias y atacan partículas rugosas a las que fermentan más rápidamente que las bacterias. Alimentos finamente molidos o altamente concentrados presentan menos hongos. Existe evidencia de que su inoculación puede incrementar la digestión de las fibras asi como el desarrollo de jóvenes rumiantes.

Los hongos producen AGV, gases y trazas de etanol y lactato.

Su contribución a la biomasa microbiana puede ser baja, como la de los protozoos, ya que se ubican en la ingesta de lento movimiento, evitando su rápido lavado. No son esenciales para la sobrevivencia de los rumiantes, están presentes en bajo número o aún ausentes en animales con dieta baja en fibras, pero se piensa que contribuyen a la digestión de forrajes de baja calidad.

Se necesitan mayores estudios para evaluar las funciones de los hongos en el rumen, sus interacciones con los protozoos, bacterias celulolíticos, metanogénicas y otras especies que emplean H_2.

Protozoos del rumen

Constituyen los organismos más conspicuos en el rumen y en el tracto digestivo de algunos monogástricos hervíboros y su rol ha sido debatido por décadas. Forman gran proporción de la biomasa (20-40% del N microbiano), pero su contribución es menor por la gran retención y su menor actividad metabólica. Su tiempo de generación es grande y la sobrevivencia en el rumen depende de las estrategias que reducen el lavado.

Pueden representar una biomasa igual o mayor que la de las bacterias.

Su contribución a la fermentación en el rumen no está muy clara, en parte por la dificultad de cultivo libre de bacterias, a las que predan. Esta constituye su principal función: ingieren partículas del tamaño de las bacterias, así como almidón, fibras, cloroplastos. La mayoría de las técnicas de estudio involucran eliminación de las bacterias: químicamente (agentes activos de superficie), por congelamiento del líquido ruminal.

Se piensa que la actividad celulolítica se realice por la flora bacteriana asociada. Algunos autores los consideran minirumiantes que albergan bacterias celulolíticas y otras que metabolizan lo que ellos ingieren.

La concentración típica en el rumen varía entre 10^4 a 10^6 protozoos por mL. Los valores pueden bajar a10^2 a 10^3 / mL con dietas altamente concentradas. Todos los protozoos del rumen son estrictamente anaerobios. Disminuyen en número desde el nacimiento a la madurez del animal. La menor concentración se encuentra en rumiantes adultos. La acidez disminuye el número de protozoos, pero no los elimina totalmente

Variedad de especies se encuentran sobre el forraje y en las dietas mezclas (forrajes/concentrados).

Rol de los protozoos: regulan la relación protozoo/ bacteria, parecen actuar como predatores no selectivos.

La degradación de las proteínas microbianas por los protozoos contribuye a aumentar el amonio del rumen, pueden contener 10 a 40% del N total del rumen. Sin embargo, el flujo de proteínas de los protozoos hacia el duodeno es menor que lo esperado desde la masa ruminal, indicando probablemente un reciclamiento de las proteínas de los protozoos en el rumen. Absorben almidón y pueden almacenar glicógeno. Pueden ser benéficos estimulando la fermentación ruminal. Liberan productos finales de la fermentación, sobretodo acetato, butirato, butirato e H_2.

La eliminación de los protozoos incrementa la proporción de propionato en el fluído ruminal

La mayoría de los componentes son *Ciliata*, los organismos unicelulares más complejos. Su biomasa es en general similar a la de las bacterias, pero pueden sobrepasarla más de 3 veces según la dieta, o incluso desaparecer. Su densidad es del orden de 10^5-10^6/mL. Las distintas especies varían en tamaño entre 25 a 250 micras, agrupados en 17 géneros de la sub-clase *Entodiniomorphes* y 2 géneros de la sub-clase *Holotriches*, que difieren en su morfología y metabolismo. Las especies presentes varían con la especie animal, la localidad, la dieta.

Los tiempos de generación varían entre 0,5 a 2 días. Los más lentos pueden desaparecer con los fluídos del rumen, pero varios permanecen adheridos a fragmentos de alimento, por lo que son más retenidos que las bacterias

y una gran proporción (más de 2/3) pueden ser lisados en el rumen.

Los ciliados constituyen la población mayor en rumiantes adultos y las clases principales de ciliados son los holotricos y los entodiniomorfos

* Holotricos: presentan cilias en toda la superficie celular

* Entodiniomorfos: la mayoría de la superficie no presenta cilias, éstas están restringidas a un solo grupo alrededor de la citofaringe (cavidad de entrada de nutrientes). Los principales holotricos son *Isotricha* y *Dasytricha*

* *Isotricha* fermenta almidón, sacarosa, glucosa, pectina

* *Isotricha intestinalis* e *Isotricha prostoma* son dos especies encontradas en el rumen, su gran tamaño hace de ellas las especies más conspicuas cuando el fluído es analizado al microscopio

* *Dasytricha* – fermenta almidón, maltosa, celobiosa, glucosa *Dasytricha ruminantium* es la única especie encontrada en el rumen. Los holotricos pueden almacenar amilopectina (reservas carbonadas del protozoo).

* *Entodinia* y *Diplodinia* son los principales géneros entodiniomorfos

Entodinium bursa y *Entodinium caudatum* son especies comunes, pero se han descripto otras especies. Fermentan almidón, hemicelulosa, celobiosa. glucosa, maltosa y sacarosa

Diplodinia spp. varias especies han sido aisladas e identificadas (ejemplo: *Diplodinium polyplastron* y *Diplodinium eudiplodinium*). La mayoría fermenta celulosa, hemicelulosa, glucosa y almidón

Los ciliados difieren de las bacterias en varios aspectos:

a) son muy móviles e invaden a los alimentos recién ingeridos tan rápidamente como las bacterias, a pesar de su menor número.

b) son capaces de almacenar hidratos de carbono adicionales en forma de un polímero insoluble, la amilopectina

c) los *Holotriches* son más fácilmente destruidos por la acidez y los *Entodiniomorphes* son menos sensibles.

d) no pueden sintetizar aminoácidos a partir de compuestos simples de nitrógeno y dependen de las bacterias, cuyos aminoácidos emplean luego de fagocitarlas (1% de las bacterias del rumen pueden ser fagocitadas por cilados en cada minuto). Son responsables de la producción de gran parte del amonio en el rumen

e) a diferencia de las bacterias, los ciliados del rumen no son esenciales para los procesos de fermentación, pero contribuyen a su eficiencia.

Ciliados celulolíticos

Pocos géneros de *Epidinium* están involucrados en la fragmentación de los restos vegetales. Secretan enzimas que promueven la separación de las células y la fragmentación del material.

En condiciones adecuadas más de la mitad de la actividad celulolítica del rumen se asocia con los ciliados. La mayor actividad se da cuando la enzima es liberada luego de la lisis celular que ocurre por exposición al O_2 en la ruminación o por hipotonía causada luego de la ingestión de agua.

Ciliados amilolíticos

Todos los *Entodiniomorphes* emplean almidón, cuyo exceso almacenan como amilopectina. Sin embargo, uno de los dos géneros de *Holotriches* no puede usar almidón. La mayoría prefiere azúcares solubles y se mueven rápidamente hacia ellos. Se estima que más de 1/3 de los azúcares ingeridos por el animal puede convertirse en amilopectina.

Otras fuentes de energía: Los ciliados son responsables de del 30-40% de la lipolisis. Incrementan el contenido de ácidos grasos saturados. Un 75% de los lípidos microbianos están normalmente asociados con los ciliados, por lo que su contribución al huésped puede ser significativa. No son muy importantes en la degradación de proteínas

de la dieta, usan las de las bacterias fagocitadas.

El nivel proteico del rumen se incrementa cuando se eliminan los protozoos.

Eliminación de los protozoos: se logra por varios procedimientos: cambios en la dieta, agregando varios agentes químicos o aislando jóvenes animales. No se afecta mucho el metabolismo del rumen, pero puede alterar el balance de los productos: una dieta de granos con protozoos presentes produce alto nivel de butirato, mientras que sin ellos, domina el propionato.

Las funciones de los protozoos en el rumen son complejas. Su eliminación parece aumentar el rendimiento microbiano y la absorción de aminoácidos por el animal, que en dietas con pajas pobres, resultaría benéfico. Mientras que en dietas ricas en almidón, los protozoos tendrían otro rol benéfico controlando la acidosis: al englobar partículas indiscriminadamente, inducen una latencia en la fermentación del almidón, limitando la acidificación.

Obtención de energía por microorganismos del rumen

El rumen es un ambiente estrictamente anaerobio, los AGV son sus productos de excreción y son absorbidos directamente desde el rumen hacia el huésped constituyendo la principal fuente de energía. La fermentación de hidratos de carbono es la principal fuente de energía para los microorganismos anaerobios del rumen. Las proteínas contribuyen con menos del 1% del total de energía y el aporte por el glicerol es menor.

La fermentación de glucosa en los 3 principales AGV conduce a:

ácido acético: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3COOH + CO_2 + H_2$

ácido propiónico: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3\text{-}CH_2\text{-}COOH + 2H_2O$

ácido butírico: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + H_2$

Etapa final: metano (respiración anaerobia):

$$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_20$$

El animal obtiene más energía cuando se produce ácido propiónico en relación al ácido acético. La liberación de H_2 y CH_4 (producto de desecho) es mayor cuando se forma ácido acético.

La principal pérdida de energía se da por la liberación de H_2 y CH_4. Vemos que la producción de 2 moles de ácido propiónico a partir de un mol de hexosa, requiere H_2 adicional. El ácido propiónico actúa como ligando del H_2 y reduce la pérdida de energía por formación de metano.

Se aprecia la complejidad de este sistema biológico, muchos de cuyos aspectos han sido estudiados extensivamente, otros restan por investigarse.

Interacciones microbianas en el rumen

Las interacciones entre los numerosos microorganismos se comprenden mejor al comparar al rumen con un sistema dinámico y cambiante. Es precisamente la flexibilidad de este complejo sistema que hace posible la conversión de un amplio rango de sustratos en AGV de los cuales depende el rumiante para obtener energía.

Las interacciones metabólicas entre las distintas poblaciones del rumen resultan esenciales para sostener a la comunidad microbiana y sus actividades. Productos del metabolismo de algunos microorganismos son fuente de energía para otros. La liberación de vitaminas y productos del metabolismo del nitrógeno constituyen fuentes para otros microorganismos. El tipo y grado de estas interacciones regulan las concentraciones y actividades de especies individuales y la naturaleza cuali y cuantitativa de los productos de la fermentación de los sustratos ingeridos.

Interacciones nutritivas

Los rumiantes no requieren vitaminas del complejo B en su dieta. Sus requerimientos son satisfechos por la microflora del rumen. Es alto el número de especies que requieren biotina y ácido para-amino benzóico (PABA) o biotina y ácido fólico. La biotina se requiere para la decarboxilación del succinato a propionato, principal reacción en la fermentación del rumen.

Interacciones entre compuestos nitrogenados

Las proteínas de la dieta se convierten en proteínas microbianas. Numerosas especies presentan actividad proteolítica, liberando péptidos, aminoácidos y amonio. La principal fuente de N para la mayoría de las especies, es el amonio, aunque algunas especies no proteolíticas emplean aminoácidos.

La figura 3 (Wolin, 1979) resume el metabolismo de las proteínas en el rumen. Las proteínas de la dieta se convierten principalmente en nitrógeno microbiano. Algunas bacterias, como *Bacteroides ruminicola* pueden degradar aminoácidos de cadena ramificada en los respectivos ácidos grasos, con un carbono menos.

Interacciones microbianas están involucradas también en la degradación de proteínas de la dieta, como por ejemplo entre *Ruminococcus albus* y *B. ruminicola* en co-cultivo en medio con celulosa y caseína, como únicas fuentes de energía y N, respectivamente. El celulolítico *R. albus* provee a la pareja con productos de la hidrólisis del polisacárido. *B. ruminicola* degrada la caseína y libera amonio e isobutirato requerido por el primero.

Fermentación de hidratos de carbono

Los polisacáridos de la dieta son la fuente principal de C y energía para los microorganismos del rumen. las interacciones son numerosas y los productos de hidrólisis son asimilados por la población asociada. A pesar de que la celulasa está presente en pocas especies de bacterias, protozoos y ficomicetos anaerobios, los productos de la hidrólisis son sustrato para organismos no celulíticos.

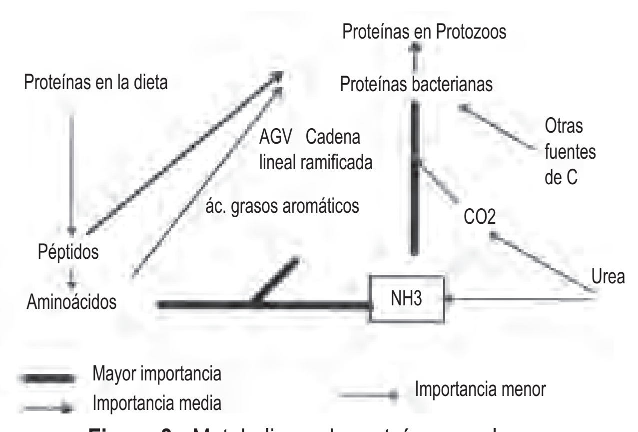


Figura 3- Metabolismo de proteínas en el rumen

Estas asociaciones nutricionales han sido verificadas en co-cultivos *in-vitro*. El éxito en la competencia por los productos solubles obtenidos de la hidrólisis de polímeros por especies no-hidrolíticas, depende de las velocidades de transporte en las células y de su metabolismo posterior.

Los productos de bajo peso molecular de la hidrólisis de polisacáridos son fermentados a acetato, butirato, H_2 y CO_2 por especies individuales de bacterias y protozoos. La producción de propionato y CH_4 requiere de la interacción de especies: las que producen succinato con otras que lo decarboxilan a propionato y CO_2. Esta interacción es muy importante en el rumen, ya que el propionato es el principal sustrato gluconeogénico para los rumiantes. La figura 4 muestra la interacción entre *Fibrobacter succinogenes* y *Selenomonas ruminantium*. El organismo celulolítico produce succinato, acetato y formiato. Cuando ambas especies crecen juntas, sin embargo, los productos finales incluyen propionato y CO_2: el succinato es intermedio en la formación de propionato y *S. ruminantium* aporta el CO_2 requerido por *Fibrobacter*.

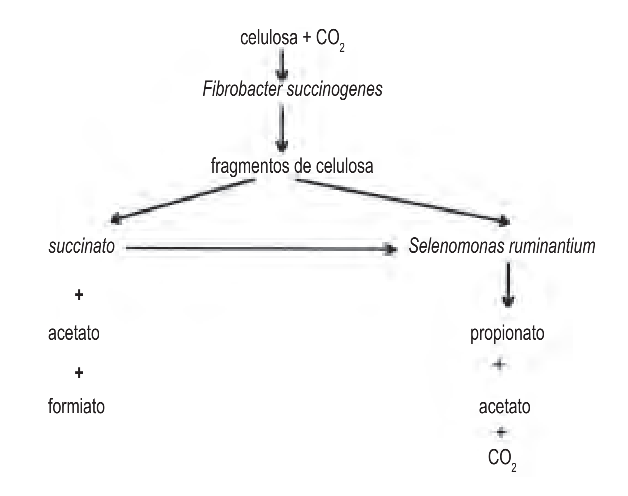


Figura 4- Interacción metabólica entre dos bacterias del rumen

Otro ejemplo de estas cadenas alimenticias se da con las bacterias metanogénicas, que emplean CO_2 e H_2, para obtener energía, con acetato o CO_2 como fuentes de C, que son liberados por microorganismos que hidrolizan y fermentan los sustratos.

Interacciones entre bacterias y protozoos

La interacción más sorprendente es la dependencia entre los ciliados y las bacterias por los aminoácidos. La eliminación de los ciliados incrementa hasta 3 veces el número de bacterias. Las bacterias emplean tanto las proteínas como la amilopectina de los ciliados lisados.

Algunas bacterias pueden funcionar simbióticamente, dentro de protozoos, otras permanecen independientes o pueden interactuar con los ciliados, por ejemplo las bacterias metanogénicas se adhieren a varios *Entodiniomorphes* cuando el H_2 es limitante. El H_2 generado por los ciliados puede ser la principal fuente de metano en el rumen. Muchos ciliados absorben trazas de O_2 del líquido ruminal, manteniendo el ambiente anaerobio.

La celulolisis se ve incrementada cuando se asocian bacterias y ciliados; este sinergismo fue verificado *in-vitro*. Otro de los roles importantes de los protozoos es estabilizar el ambiente: secuestran rápidamente al almidón y azúcares solubles, restringen la formación de ácido láctico y limitan las fluctuaciones del pH. La liberación de AGV a partir de las reservas de amilopectina de los ciliados, contribuye a la nutrición del huésped entre ingestas.

Otro mecanismo que facilita la sobrevivencia de especies no-hidrolíticas en este ecosistema son las interacciones entre presa y predator: una población, como los protozoos obtiene energía y/o carbono a partir de su presa (las bacterias). Los protozoos pueden obtener estos requerimientos para su desarrollo por fermentación de sustratos; las bacterias parecen ser más bien precursores para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos y como fuente de lípidos. La fermentación de las reservas carbonadas de las bacterias puede contribuir también al metabolismo del protozoo.

Producción de CH_4

Ninguna de las bacterias o protozoos fermentadores producen metano, pero algunas producen formiato, H_2 y CO_2. Las bacterias metanogénicas pueden luego transformar el H_2 y el CO_2 en CH_4. En el rumen la principal vía de formación de metano es a partir de H_2 y CO_2. Su formación a partir de acetato (formado por conversión de propionato, butirato y otros AGV), no ocurre en el rumen y la producción a partir de AGV es un proceso muy lento. *Methanobacterium ruminantium* se encuentra presente en alta concentración en el rumen. *Methanosarcina barkeri* ha sido aislada de rumen de vacas y ovejas, crece lentamente con H_2 y CO_2, forma CH_4 a partir de grupos metilos (metanol y metilaminas) y no compite por el H_2 con otros metanogénicos. *Methanobrevibacter* spp. es probablemente el metanogénico más significativo en el rumen bovino, pero se requieren mayores estudios para caracterizar a las especies actuantes.

Casi todo el H_2 producido es empleado por las bacterias metanogénicas (transferencia de H_2 interespecie). Aproximadamente 800 litros de H_2 se producen y se usan diariamente para formar 200 litros de CH_4 en una vaca de 500 kg y sólo trazas de H_2 se acumulan en la fase gaseosa del rumen (Hungate, 1966).

Interacciones y proporciones de AGV

Existe considerable interés en alterar las fermentaciones en el rumen para incrementar la eficiencia de productos ruminales. Los aditivos alimenticios, como los ionóforos Monensina o Rumensina y Lasolacida, inhiben a los productores de H_2, favorecen la producción de propionato y reducen la producción de metano, aumentando por lo tanto, la eficiencia de conversión de los sustratos en alimento para el ganado. Estas sustancias actúan como quelantes del sodio, potasio y otros cationes, alterando el transporte a través de la membrana.

Ingeniería genética de microorganismos del rumen

La manipulación genética de organismos del rumen para producir especies más eficientes en la digestión de los alimentos está siendo practicada. Como los microorganismos del rumen operan como un consorcio, es decir un sistema mixto y su ecología es opuesta a la de un cultivo puro a partir de una sola célula, la competancia y el sintrofismo deben ser considerados en los intentos de manipulación genética.

La transferencia genética natural en este ambiente debe ocurrir y van Soest (1994) señala que considerando que los microorganismos del rumen, incluidos las bacterias

metanogénicas, son los más antiguos en la escala biológica (más de 3.000 millones de años), deben haber tenido suficientes oportunidades para evolucionar y cambiar hacia mayor eficiencia.

Parecería más oportuno, para este autor modificar los materiales vegetales, haciéndolos más degradables por la microflora. Cita, sin embargo, casos de éxitos en la inoculación de microorganismos que degradan mimosina, aminoácido tóxico contenido en *Leucaena*, ausentes en la mayoría de los rumiantes.

Conclusiones

Esta breve descripción del ecosistema del rumen trató de evidenciar su complejidad y dinamismo. Las interacciones microbianas son allí numerosas y es precisamente la flexibilidad de este complejo sistema que hace posible la conversión de un amplio espectro de sustratos en ácidos grasos volátiles de los cuales depende el rumiante para obtener energía.

Las predicciones sobre la marcha de las fermentaciones resulta difícil dada la suma de factores que inciden: ambiente, especie animal, dieta. En general, la activa fermentación de sustratos celulósicos resulta en mayores proporciones de ácido acético. La fermentación de almidón resulta en mayor proporción de ácido propiónico.

Los tipos de fermentación con dietas ricas en azúcares, incluyendo melazas, es difícil de predecir. Efectos asociativos positivos o negativos pueden resultar cuando se combinan alimentos. Muchos de los últimos efectos pueden minimizarse regulando el régimen alimenticio, el grado de procesamiento de los granos y el tipo de concentrado adecuado a cada combinación nutritiva.

Numerosos intentos de mejoramiento de la actividad de los microorganismos del rumen se llevan adelante e incluyen manejo de la dieta, de aditivos (antibióticos, sustancias tampones, antiprotozoarias), que tienden a incrementan el nivel nutritivo del animal.

Bibliografía

Dehority, B. A. **Rumen Microbiology**, 2003, Nottingham University Press, Londres, 372pp

Hobson, P. N., Stewart, C.S. **Rumen Microbial Ecosystem**, 1997, Kluver Academic Publishing, London

Hungate, R.E. **The Rumen and Its Microbes**, 1966 ,Academic Press, N.Y., London

Orskov, E.R. y M. Ryle **Energy Nutrition in Ruminants**, 1990 Elsevier Applied Science, London, N.Y.

Prescott, Harley y Klein. **Microbiología**. 1999 McGraw-HIl.Interamericana

Stewart, C.S. y M.P. Bryant, The Rumen Bacteria. En: The **Rumen Microbial Ecosystem**, 1988 Hobson, P.N. (ed), Elsevier Applied Science, London, N.Y.

Stewart, C.S. The Rumen bacteria. En: **Rumen Microbial Metabolism and Rumiant Digestion**, 1991, Jouany, J.P. (Ed), INRA Editions, París.

Theodorou, M.K.; S.E. Lowe y A.P.J. Trinci Anaerobic fungi and the rumen ecosystem. 1992 Micology Series, vol 9, Marcel Dekker, N.Y.:43-72

Van Soest, P.J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**, 1994, Cornell University Press, Ithaca, London

Wolin, M.J. **The rumen fermentation: a model for microbial interaction in anaerobic systems**. 1979, Adv. Microb. Ecol. 3: 49-77

Preguntas de repaso

1) ¿Por qué el ambiente del rumen es muy particular?
2) ¿Cómo funcionan los microorganismos en este ambiente?
3) Explique brevemente las transformaciones de la celulosa hasta los compuestos que son absorbidos por el animal
4) ¿La metodología de estudio resulta sencilla? Por qué?
5) ¿Se puede alterar la microbiología del rumen?
6) ¿De donde se origina el metano eliminado por el ganado?
7) ¿Cómo se puede regular el funcionamiento del rumen?
8) ¿Qué sucede con la lignina de las ingestas?
9) Señale algunos ejemplos de sinergismo entre microorganismos del rumen
10) Analice los gases que se liberan en los rumiantes y su relación con el efecto invernadero

Los microorganismos en los alimentos y la industria

19 Fermentaciones láctica y alcohólica Aplicaciones biotecnológicas

Desde muy antiguo el hombre empleó a los microorganismos en la producción y conservación de alimentos, aun sin conocerlos. Los métodos empleados antes de la introducción de la refrigeración, radiaciones, aditivos, etc., para la conservación de hortalizas, pasturas, granos, leche, etc. eran

* salado

* secado al aire o ahumado

* fermentaciones ácidas

El empleo de otra fermentación, la alcohólica, permitió la conversión de frutas en productos estables y derivó en aplicaciones biotecnológicas muy importantes del punto de vista económico.

Fermentación láctica

Es uno de los procesos microbianos más empleados a nivel mundial ya que involucra a la leche y sus derivados: manteca, yogur, leches ácidas, quesos, producción de caseína, otros subproductos, en los ensilados (forrajes, granos, pescado, etc.), en la conservación de frutas y hortalizas. La fermentación láctica puede ser como vimos en el capítulo 3, homo o heterofermentativa.

- **fermentación homoláctica**, las bacterias degradan la glucosa por la vía glicolítica y el producto final es en un **90% ácido láctico**

- **fermentación heteroláctica** los productos finales son **ácido láctico, etanol y CO_2, en cantidades equimoleculares.** Las bacterias carecen de enzimas de la vía glicolítica (aldolasa y triosafosfato isomerasa) y la degradación de la glucosa se realiza por la vía de las pentosas. El rendimiento energético es menor: 1 solo mol de ATP, en lugar de 2 como en los homofermentadores que producen el doble de biomasa por mol de azúcar fermentado.

No se acumula poder reductor y la producción de CO_2 es una forma sencilla de distinguir un grupo del otro.

Las bacterias del ácido láctico

Pertenecen a la familia *Lactobacteriaceae*: Gram positivas, comunmente no móviles, no esporuladas que producen ácido láctico como producto final y único del metabolismo fermentativo. Los integrantes de este grupo carecen de porfirinas y citocromos, no realizan fosforilación por transporte de electrones y obtienen energía solamente por fosforilación a nivel del sustrato. Todas las bacterias del grupo crecen en **anaerobiosis,** pero la mayor parte de ellas no son sensibles al O_2 y pueden crecer con o sin O_2, por lo que son **anaerobios aerotolerantes**.

Algunas cepas pueden tomar O_2 por el sistema de **flavoproteína oxidasa**, dando H_2O_2, pero la mayoría carecen de **catalasa** y deben eliminar el agua oxigenada por otras enzimas, como las **peroxidasas.**

La mayoría de las bacterias acidolácticas obtienen energía sólo del metabolismo de los carbohidratos y su distribución está restringida a ambientes con azúcares. Exigen además aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas.

Los géneros han sido definidos en base a la morfología y al tipo de metabolismo fermentativo (cuadro 1).

Cuadro 1 - Principales géneros de bacterias lácticas

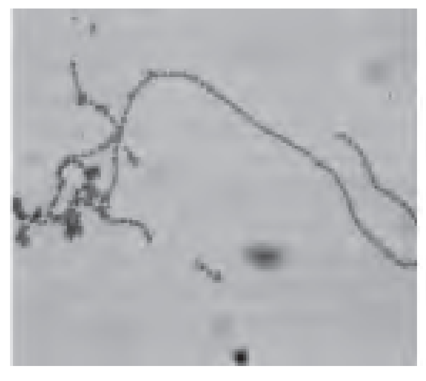
género	forma y agrupaciones	fermentación	ADN (mol GC%)
Streptococcus	cocos en cadena	homofermentativo	34-46
Leuconostoc	cocos en cadena	heterofermentativo	38-41
Pediococcus	cocos en tétrada	homofermentativo	34-42
Lactobacillus	bacilos en cadena	homofermentativo	32-53
	bacilos en cadena	heterofermentativo	34-53
Enterococcus	cocos en cadena	homofermentativo	38-40
Lactococcus	cocos en cadena	homofermentativo	38-41

Como se aprecia los géneros *Streptococcus, Leuconostoc y Pediococcus* presentan relaciones de bases en su ADN bastante similares y existe pequeña variación entre cepas. El género *Lactobacillus,* por el contrario posee miembros con diversa composición del ADN y no constituye un grupo homogéneo.

***Streptococcus*:** se presentan en cadenas de cocos, son mesófilos (óptimo entre 20 y 30ºC), por lo que el calentamiento los destruye con facilidad, son homofermentativos y presentan una amplia variedad de especies con habitats muy diversos, algunos son patógenos. Constituyen la flora normal de la leche (figura 1) (Prescott *et al.*, 1999).

***Leuconostoc*:** son diplococos o en cadenas, heterofermentativos, por lo que son poco acidificantes. Su habitat natural lo constituyen los vegetales y también se encuentran en la leche. Se emplean mucho como cultivos iniciales en la industria láctica por sus propiedades aromatizantes (diacetilo y acetoína al descomponer el citrato), aunque han sido desplazados por el *S. diacetilactis.* Algunas cepas producen grandes cantidades del polisacárido dextrano (α 1,6-glucano), de uso médico.

***Lactobacillus*:** son bastones que varían de largos y delgados a cortos y curvos. La mayoría son homofermentativos, pero algunas especies son heterofermentativas. El género se ha dividido en tres subgrupos principales (cuadro 2). Se los encuentra en la leche, ensilados, frutas y hortalizas conservadas, en la saliva, en el intestino humano y de animales. Producen grandes cantidades de ácido láctico, resisten altas temperaturas, son termodúricos. *L.*





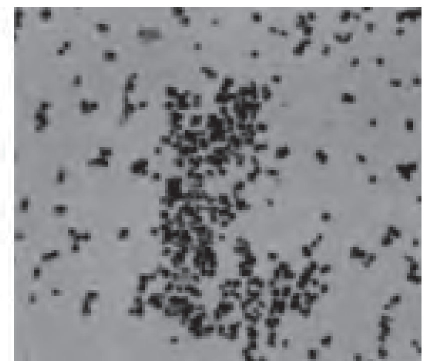


Figura 1- Estreptococos. a) *Streptococcus pyogenes* (x900), b) micrografía electrónica de barrido de *Streptococcus* (x33.000), c) *S. pneumoniae* (x900)

delbrueckii se emplea en la producción de yogur, *L. acidophilus* en la de leche ácida y otras especies participan en la producción de repollo fermentado, ensilaje y *pickles.*

Resisten los pH bajos por lo que continúan creciendo cuando el pH descendió e inhibió a otras bacterias lácticas. Son, por lo tanto responsables de las etapas finales de las fermentaciones acidolácticas. Raramente son patógenos.

Se los encuentra en la superficie de las plantas, en productos lácteos, carne, cerveza, frutas y muchos otros materiales.

Aplicaciones de la fermentación láctica

La fermentación láctica acidifica el medio a valores de pH menores de 5,0, eliminando la posibilidad de crecimiento de microorganismos que alteran los alimentos. Esta práctica se emplea en la conservación de alimentos para el hombre, como los derivados de la leche y en la conservación de frutas y hortalizas, en los *pickles* y en alimentos para animales, como los ensilados.

Cuadro 2 - Características de los subgrupos en el género *Lactobacillus*

Características	Especies	ADN (mol%GC)
Homofermentativos		
Ac.láct. principal producto (más 85% de la glucosa, no dan gas,aldolasa)		
1) crecen a 45ºC pero no a 15ºC	*L.delbrueckii*	50
bacilos cortos	*L. acidophilus*	32-37
2) crecen a 15ºC, variable a	*L. casei*	
45ºC, bacilos cortos y coreniformes	*L. plantarum*	45-46
	L. curvatus	42-44
Heterofermentativos		
producen cerca del 50% de ác.	*L. fermentum*	*53*
láctico, CO_2 y etanol, sin	*L. brevis,*	*45*
aldolasa, fosfocetolasa presente,	*L.buchneri*	45
bacilos largos y cortos	*L. kefir*	*41*

Leche y derivados

La leche se define como el producto íntegro de ordeñe total e ininterrumpido de una hembra lechera sana, descansada y bien alimentada, recogida higiénicamente y sin calostro. Su composición (g/L) indica que es un muy buen sustrato para la microflora:

agua	873	sales	9
glúcidos:lactosa	49	del ácido cítrico	2
lípidos	35	del ác. fosfórico	2,6
materia grasa	34	otras	4,4
lecitina	0,5	compuestos diversos	
fracción insaponificable	0,5	extracto seco total	127
proteínas	34	extracto seco desgrasado	93
caseína	27		
proteína soluble	5,5		
N no proteíco	1,5		

Se deben incluir carotenoides, vitaminas, enzimas, esteroles, que se encuentran en pequeñas cantidades pero ejercen un efecto relevante. El pH neutro es adecuado para la mayoría de los microorganismos, por lo que este alimento es atacado por una micropoblación variada. La temperatura regulará la composición y velocidad de crecimiento de la misma.

A medida que aumenta la temperatura de conservación de la leche hasta 35-40ºC se evidencia mayor desarrollo microbiano. Por encima de 40ºC se desarrollan especies termófilas como *Bacillus, Clostridium y Steptococcus.* Entre 20 y 40ºC prodominan mesófilos como *Streptococcus*. A bajas temperaturas predominan sicrófilos como *Pseudomonas, Alcaligenes y Achromobacter.*

Alteración natural

Por tratarse de un producto muy rico en nutrientes y poseer un azúcar fácilmente degradable, la leche es muy alterable**. Se evidencian 4 etapas:**

* **Período germicida**: luego de ordeñada no se detecta crecimiento microbiano por la presencia de sustancias inhibidoras como **lactoperoxidasa y aglutininas**. Este período varía de pocos minutos a 2 horas dependiendo **de condiciones de temperatura.**

* **Período de acidificación**, en el que se desarrollan activamente los microorganismos productores de ácido láctico a partir de lactosa hasta que su concentración llega a un 1%. La figura 2a muestra la variación de pH del sustrato a medida que la fermentación progresa. A pH cercanos a 4,0 la acidificación se detiene por **autoinhibición** de la flora láctica. En la figura 2b se aprecian las variaciones de la lactosa, azúcar de la leche, y el ácido láctico, en el tiempo.

* **Fase de neutralización:** el ácido estabiliza al producto pero pueden prosperar hongos y levaduras si la temperatura es adecuada, que consumen el ácido láctico. En la superficie se aprecia densa capa de hongos. El producto se desestabiliza y el resto de las fracciones orgánicas son degradadas.

* **Fase de putrefacción** llevada a cabo por bacterias y hongos que permanecieron al estado latente a pH bajo y ahora atacan la caseína (proteolisis) y luego los lípidos (lipolisis), descomponen totalmente la leche dejando un líquido claro, que puede poseer sustancias tóxicas.

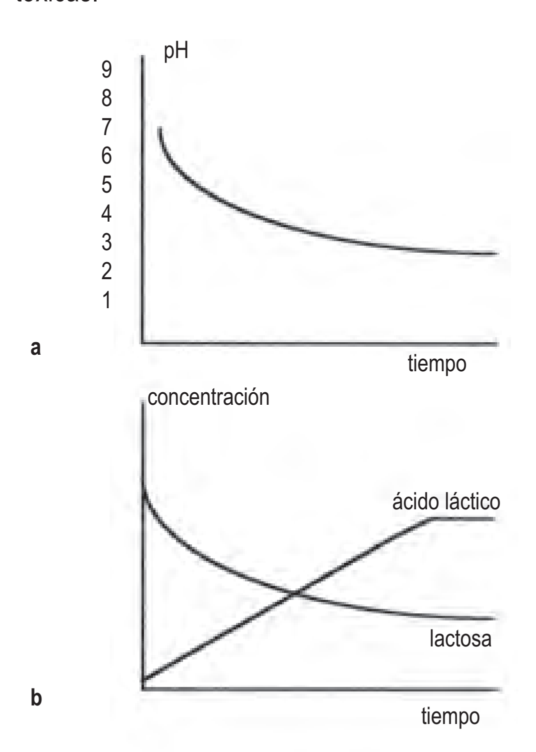


Figura 2 - a) Evolución del pH del sustrato en el tiempo, b) Variación en la concentración del ácido láctico y lactosa

Fermentaciones específicas de la leche

1. Fermentación láctica, que como vimos es producida por enzimas microbianas que liberan ácido láctico de la lactosa. Las bacterias más importantes son *Streptococcus lactis y S. cremoris*, mesófilos y presentes en la leche. Se produce la precipitación de la caseína (**cuajada)**. *Leuconostoc citrovorum* también produce ácido láctico, *L. dextranicum* produce ácido acético, etanol y CO_2. *Lactobacillus casei* es usado en la preparación de quesos, *L. acidofillus. L. bulgaricus y L. plantarum* son importantes en la elaboración de leches ácidas.

2. Fermentación gaseosa: otros microorganismos no deseables producen ácidos y gases: micrococus, coliformes. *Escherichia coli y Aerobacter aerogenes* liberan CO_2 e H_2 a partir de lactosa. Otros microorganismos pueden ser *Clostridium butyricum* y levaduras como *Candida y Torulopsis.*

3. Producción de aromas y sabores agradables: *Streptococcus citrovorus, S. paracitrovorus* que dan productos volátiles como el ácido acético o el diacetilo a partir de ácido cítrico.

4. Fermentación proteolítica: producida por microorganismos que desdoblan proteínas dando olores y sabores desagradables. Los organismos son *Streptococcus liquefaciens, Clostridium butyricum, Bacillus subtilis, Serratia marcens, Pseudomonas putrefaciens.*

5. Fermentación lipolítica: causada por microorganismos que desdoblan las grasas en glicerol y ácidos grasos y en consecuencia se produce rancidez: *Pseudomonas fluorescens, Achromobactyer lipoliticum*, levaduras (*Candida lipolitica*), hongos (*Penicullum* spp., *Geotrochum candidum)*.

Derivados de la leche

Los productos fermentados son consecuencia de la actividad controlada de un conjunto de microorganismos. Con la pasteurización de la leche fue necesario sustituir la microflora natural por cepas seleccionadas y controladas que aseguren la estandarización de los productos.

La pasteurización elimina a la mayoría de los microorganismos que alteran el producto, pero no esteriliza.

Tipos: baja 62ºC durante 30'
alta 72ºC durante 15"
ultrapasteurización 140ºC durante 1"

Esterilización : se incrementa la distribución de leches esterilizadas (larga vida), las que son sometidas a 143ºC durante 3 segundos, en tubos concéntricos y enfriada rápidamente.

En la última parte del siglo 19 se aislaron por primera vez los microorganismos responsables de la fermentación láctica. En la actualidad se emplean grandes volúmenes de **inoculantes** adecuadamente seleccionados por criterios:

* temperatura de crecimiento y actividad
* acidificación : nivel de ácido láctico y velocidad de formación
* actividad proteolítica, importante en la preparación de quesos
* estabilidad genética de las cepas
* resistencia a bacteriófagos

Muchos de estos microorganismos empleados como iniciadores (*starter*) contienen numerosos **plásmidos** de particular importancia porque codifican propiedades esenciales como: fermentación de la lactosa, actividad proteinasa, metabolismo del citrato, propiedades antagonistas, resistencia a bacteríofagos. Algunas especies poseen estos genes en el cromosoma. La pérdida de estos plásmidos explica la inestabilidad de algunas de estas propiedades esenciales (Varnam, 1993). El análisis molecular de los plásmidos que albergan los genes que codifican estas propiedades hace posible aplicar los conocimientos de la genética de las bacterias lácticas para mejorar cepas existentes o producir nuevas. La inclusión de estos genes en el cromosoma es otra de las orientaciones para incrementar la estabilidad de los cultivos.

Los **inóculos** se producen en la actualidad en general en laboratorios especializados y se comercializan como cultivos **liofilizados:**

- La ampolla que los contiene se llena con leche estéril descremada, se agita enérgicamente para suspender el cultivo y se incuba a 23-24ºC por 16-18 horas

- Estos cultivos se repican en leche descremada (1 litro) en condiciones asépticas y se incuban 12 horas a 23-25ºC (primer subcultivo), luego se logran otros subcultivos a razón del 2% de inóculo y 18 horas de incubación. Uno de ellos se usa para mantener la cepa en el refrigerador.

Un cultivo puro no se puede repicar indefinidamente sin que se alteren sus características. Debe procurarse nuevamente un cultivo puro. El cuadro 3 resume algunos de los productos obtenidos por fermentaciones a partir de la leche.

Leches ácidas

Yogur

Se prepara a partir de leche con poca grasa inoculada con cultivo mixto de:

Streptococcus thermophillus, para la producción de ácido láctico y *Lactobacillus bulgaricus*, que contribuye al sabor y aroma.

La fermentación se realiza a 45ºC durante varias horas, (figura 3) la acidez coagula la leche produciendo también la digestión parcial de la caseína que facilita su asimilación. El yogur recién preparado contiene 10^9 bacterias por gramo. Las formas sólidas se preparan con leche concentrada y se fermentan durante 2-3 horas en los envases de venta. El yogur líquido se incuba a una temperatura más baja y por un tiempo mayor, luego se mezcla y se enfría antes del envasado.

Leche ácida

Es otro tipo de leche fermentada preparada con cultivos de *Lactobacillus acidophillus* a la que se le atribuye mayor efecto dietético debido a que la bacteria sobrevive en el estómago y produce ácido láctico en el intestino lo que inhibe el desarrollo de microorganismos de la putrefacción. Crece más lentamente y coagula la leche dentro de las 4 a 8 horas.

Cuadro 3 - Alimentos obtenidos por fermentación láctica

Producto	Materia prima	Microorganismo
queso	cuajo de leche	*Streptococcus* spp. *Leuconostoc* spp.
Kefir	leche	*Streptococcus* spp. *Saccharomyces kefir*
yogur	leche desnatada y leche en polvo	*Streptomyces thermophillus* *Lactobacillus bulgaricus*
leche ácida	leche	*Lactobacillus acidophillus*
manteca	crema de leche	*Lactobacillus bulgaricus*

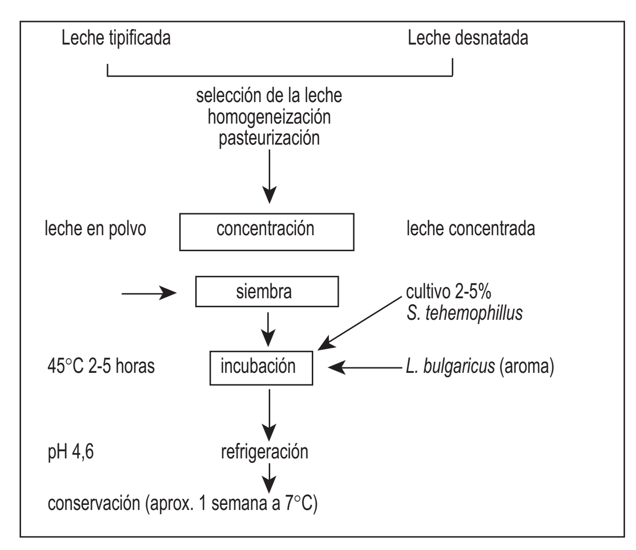


Figura 3- Esquema en la preparación de yogur

Kefir

Esta leche ácida se consume mucho en Europa Oriental. Las bacterias lácticas se suplementan con una levadura fermentadora de la glucosa que le proporciona a esta bebida contenido alcohólico de 1-2%. La levadura es *Saccharomyces kefir* y las bacterias *Lactobacillus caucasicus y Streptococcus* spp. El alimento se prepara agregando a la leche gránulos de kefir de una fermentación anterior.

Otras bacterias de interés son las **bifidobacterias** (pertenecientes a los actinomicetes). El género *Bifidobacterium* contiene bacilos Gram positivos irregulares, no esporulados con forma de bacilo y también bifurcados en los extremos (figura 4) (Prescott *et al.,* 1999), son inmóviles, anaerobias y fermentan lactosa y otros azúcares dando ácidos acético y láctico. Son habitantes típicos del tracto intestinal humano y se les atribuyen muchas propiedades beneficiosas, mejoran la tolerancia a la lactosa, previenen diarreas en niños y son actualmente incorporados en numerosos productos fermentados.

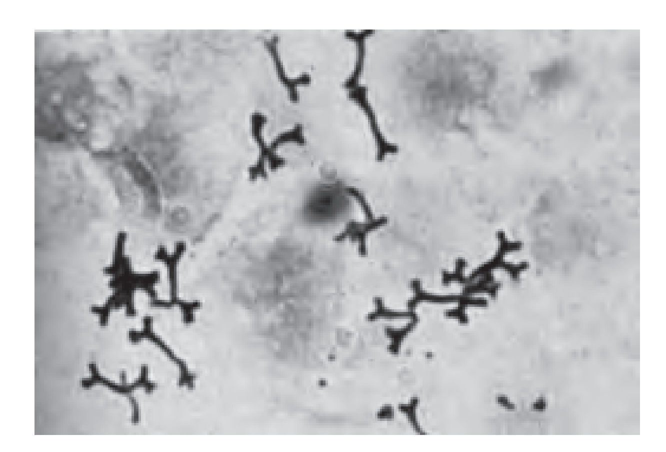


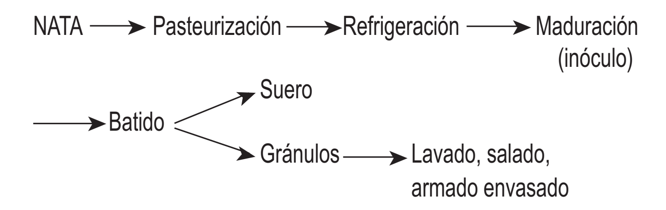


Figura 4- Bifidobacterias

Manteca

Su preparación es en parte microbiológica ya que el agriado inicial de la leche por *Streptococcus* es necesario para la separación de la grasa. Estos organismos producen pequeñas cantidades de acetoína que es oxidada a **diacetilo** (CH_3-CO-CO-CH_3), compuesto responsable del sabor. Es común inocular crema pasteurizada con cultivos puros de *S. lactis, S. cremoris, L. citrovorum y L. diacetylactis.*

Esquema



Quesos

Es el producto resultante de la concentración de la materia seca de la leche por coagulación a través de la acción de microorganismos lácticos. La leche posee microorganismos propios y provenientes del ambiente. Algunos son perjudiciales y otros se usan para elaborar quesos en forma artesanal. La **leche pasteurizada** asegura la estandarización de la producción al destruir microorganismos patógenos y saprofitas, colibacterias, levaduras y enzimas de la leche.

Etapas

* Fermentación, con o sin inoculación con *S. lactis, S. cremoris, S. casei, Lactobacillus* spp.

Aunque hay innumerables tipos de quesos todos requieren la formación de la **cuajada**, que se separa de de la fracción líquida o suero. La caseína sufre cambios físico-químicos y precipita como paracaseinato de calcio. Como coagulante se puede usar cuajo o ácido.

El primero es más usado y se obtiene del estómago de terneros lactantes y su principio activo es una proteína, la renina, activa a pH ácidos (pH 3,8) que se logra por el ácido láctico de las lactobacterias al fermentar la lactosa. El ácido láctico produce además sabores característicos de estos productos.

* La cuajada pasa por un proceso de maduración, excepto en algunos quesos frescos o ricota. La dureza del queso se obtiene en esta etapa: cuanto más agua pierda la cuajada y más se comprima, más duro será el producto. También ocurre hidrólisis de de grasas por enzimas microbianas y la renina.

Los quesos livianos maduran por enzimas de bacterias, levaduras y hongos que crecen en su superficie. Los semiblandos como Limburger maduran por bacterias y otros contaminantes de su superficie. El Roquefort lo hace por acción de mohos del género *Penicillum* cuyas esporas se inoculan en la suferficie, luego se aprecia el color de las hifas (verde, azul, blanco) penetrando en la pasta. El Camambert madura en pequeños envases para que las enzimas del *Penicillum* que ha crecido aeróbicamente en la superficie, difundan a interior para realizar la maduración. *Propionibacterium* produce en el queso tipo suizo los típicos "ojos" producidos por la liberación de gases.

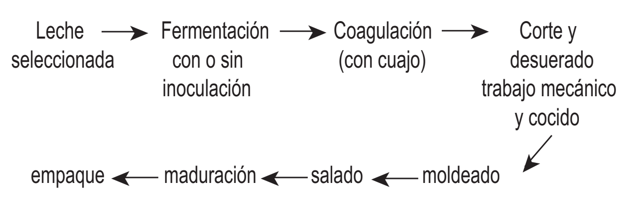
En los quesos de pasta dura, como Cheddar o Suizo, las bacterias lácticas crecen anaeróbicamente en su interior, mueren y se autolizan.

El cuadro 4 muestra características de procesos microbiológicos y bioquímicos y los microorganismos responsables de la producción de distintos tipos de quesos.

Cuadro 4 - Microbiología de distintos tipos de queso

Tipos	Proceso	Microorganismo
quesos (en general)	temperatura de fermentación: 35ºC 42ºC	*S. lactis o cremoris* *Lactobacillus* (termófilo)
quesos duros (Chedar, suizo)	proteolisis, lipolisis	bacterias lácticas dentro del queso
quesos blandos no madurados: Requesón Mozzarella		*Lactococcus lactis* *S. thermophilus,* *L. bulgaricus*
madurados (Camambert)	proteolisis, lipolisis	crecimiento superficial de hongos: *Penicillum spp.* Seguidos de bacterias *Bacterium*
queso suizo	ferm. propiónica, lipolisis y producción pigmento azul	*Propionibacterium* spp. *Penicillum roqueforti*
quesos muy duros madurados	12-16 meses de maduración (Parmesano)	*Lactobacillus lactis,* *L. cremoris,* *S. thermophilus*

Esquema general:



Para finalizar, los subproductos lácteos se pueden agrupar según su contenido de agua:

con alto porcentaje de agua: la leche

con alto contenido de gasa: la manteca y crema de leche

con alto porcentaje de proteínas: el queso

Conservación de frutas y hortalizas por fermentación láctica

Por fermentación ácida se conservan hortalizas de hoja, hortalizas subterráneas y frutas, las más usadas son: pepinos, repollos, cebollas, tomates verdes. El producto resultante se denomina ***pickle*** **o encurtido.**

Pickle

Producto acidificado resultante de la fermentación láctica de ciertos vegetales.

La fermentación láctica la realizan las bacterias que se encuentran en la superficie de los vegetales. En el proceso de conservación se procura favorecer el desarrollo de las bacterias lácticas e impedir el desarrollo de otros microorganismos que pueden alterar la calidad del alimento. Las condiciones que favorecen el desarrollo de la flora láctica son: **anaerobiosis y concentración de sal a 5%**. Se produce la siguiente secuencia de microorganismos:

Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus cereviseae, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis

Leuconostoc mesenteroides realiza fermentación heteroláctica y los productos finales son ácido láctico, ácido acético, alcohol y CO_2. El CO_2 desaloja el O_2 del medio y asegura la anaerobiosis. El ácido láctico baja el pH del medio, lo que inhibe la actividad de la restante microflora presente en los vegetales.

Se estimula así la acción de las bacterias lácticas completándose la secuencia. *Pediococcus cereviseae* fermenta manitol y dextranos producido por *Leuconostoc mesenteroides. Lactobacillus plantarum* es el principal productor de ácido láctico de esta secuencia microbiana.

Chucrut

Es otra técnica de conservación de vegetales por acidificación. En este caso el vegetal usado es el repollo que se corta en tiras, se sala en seco y se deja fermentar en recipientes adecuados. El iniciador del proceso fermentativo es *Leuconostoc mesenteroides* que produce las condiciones necesarias para la actuación de las restantes bacterias lácticas.

Cuadro 5- Alimentos vegetales conservados por fermentación láctica

Alimento	Materia prima	Microorganismo
Pickle	Ciertas hortalizas y frutas	*Leuconostoc mesenteroides* *Pediococcus cereviseae* *Lactobacillus plantarum* *Lactobacillus brevis*
Chucrut	Repollo	*Leuconostoc mesenteroides*
Salchichas ahumadas	Carnes y pescado	*Lactobacillus plantarum*
Salame		*Pediococcus cerevisiae* *Lactobacillus plantarum*
Salsas de pescado		*Lactobacuillus* spp *Aspergillus glaucus (Japon)*

Ensilados

La conservación de forrajes o alimentos, granos, tubérculos, pescado, etc. en ausencia del aire, ha sido empleada por el hombre desde hace miles de años. En el caso de alimentos para el ganado, la finalidad del proceso es conservar los forrajes con la mayor calidad posible, por un lapso más o menos prolongado, de forma de emplearlos en el momento en que se los necesite. Conserva el valor nutritivo del forraje a diferencia del proceso de secado al aire (**heno**).



Figura 5- Silo sobre el terreno. El forraje picado es apisonado para eliminar el aire

El forraje verde que se desea conservar por vía húmeda es cosechado por una máquina especial, que lo corta y pica en trozos pequeños que se transportan y acumulan sobre el terreno o se coloca en construcciones especiales, llamados **silos** (figura 5).

Primera fase: respiración aerobia, los carbohidratos presentes en el forraje cortado son respirados en presencia de **aire**; la fotosíntesis continúa mientras las plantas estén expuestas al sol.

$$\text{azúcares} + O_2 \longrightarrow CO_2 + H_2O + \text{calor}$$

Efectos: disminución de carbohidratos
producción de CO_2 y H_2O
aumento de la temperatura
disminución del O_2 en la masa

Si esta etapa se prolonga el forraje será degradado por una variedad de microorganismos. La intensidad de la misma se puede evaluar por el calor liberado. La detención de la respiración y la muerte rápida de las células se puede lograr por distintas vías:

* artificialmente, por el agregado de ácidos (acético, etc.)

* naturalmente, permitiendo la evolución de los procesos naturales, como es la fermentación. La rapidez y eficacia de la eliminación del aire depende de varios factores; estado de madurez, contenido de humedad, sistema de cosecha del forraje, método empleado. Cuando el silo está bien construido, sin posibilidad de entrada de aire, esta etapa es breve, se anula la actividad de microorganismos aerobios, se liberan los jugos celulares y la temperatura comienza a disminuir.

Segunda fase, fermentación, en ausencia de aire: si el forraje está bien compactado en los silos se elimina rápidamente el exceso de aire y comienza el proceso de ensilaje. En esta etapa se desarrollan microorganismos fermentadores, favorecidos por la baja disponibilidad de O_2 y la difusión del contenido celular con azúcares fermentescibles. Los principales productos son **ácidos láctico, acético, butírico,** que acidifican el medio.

Un **buen ensilado** se caracteriza por poseer:

* alta proporción de ácido láctico

* niveles variables, pero bajas de ácido acético

* muy bajo o nula cantidad de ácido butírico

* ínfima proporción de amonio, lo que significa que las proteínas han sido degradadas con disminución del valor nutritivo del silo

Los microorganismos fermentadores se encuentran en la superficie de los vegetales, en el suelo y se desarrollan una vez que las condiciones les son favorables. Cada grupo posee condiciones óptimas de temperatura, humedad y presencia y/o ausencia de aire para su mejor desarrollo (cuadro 6).

La fermentación láctica homo y heterofermentativa es realizada por la microflora presente en forraje, granos, etc.

La figura 6 esquematiza las fases del proceso en forrajes: una fase aeróbica en el campo, una fase de fermentación inicialmente aerobia, una de almacenamiento y descarga que resulta en estabilización o deterioro, dependiendo del nivel de pH obtenido y el grado de entrada del aire.

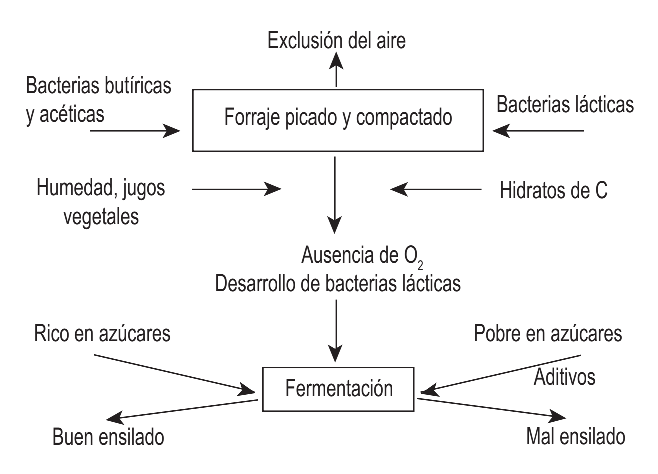


Figura 6- Etapas en el ensilaje de un forraje verde

Cuadro 6 - Procesos microbianos en el silo.

Fermentación	Temperatura	pH	Organismo
láctica	5 a 60ºC óptimo 35ºC	3 y 4	*L. plantarum* *L. brevis* *L. casei* *S. lactis*
acética	18-25ºC		grupo coliforme
butírica	20-40ºC	4 y 5	*Clostridium*

La producción de ácido acético, causada por microorganismos del grupo coliforme es de escaso significado en los silos. La fermentación butírica no es deseada, pues causa sabores desagradables, sobre todo para el hombre. Los animales pueden tolerarlo. Se puede producir también mezcla de ácido acético, etanol e H_2. La temperatura más favorable para especies de *Clostridium* es entre 20 y 40ºC y no soportan pH inferiores a 4,0.

Ventajas de la fermentación láctica:

* **asegura alta concentración de ácido láctico**, elemento nutritivo y conservador, sin la formación de productos secundarios no palatables o innecesarios

* conservación de un mayor porcentaje de elementos nutritivos, al desarrollarse a bajas temperaturas se minimizan las pérdidas por respiración. Los microorganismos responsables se encuentran normalmente en número suficiente en el exterior de forrajes y su sabor y olor son apetecidos por el ganado

* no causa efectos secundarios o perjudiciales en la salud del ganado, ni altera sabor o apariencia de derivados de la leche, como manteca, queso.

Condiciones para un rápido ensilaje

* Medio anaerobio: se debe excluir rápidamente el aire atrapado en la masa

* Temperatura entre 5 y 60ºC; entre 5 y 20ºC las únicas bacterias que pueden desarrollarse son las lácticas, impidiendo la fermentación butírica. El cuadro 7 muestra las proporciones relativas de ambos ácidos.

Cuadro 7 - Ensilados a distintas temperaturas

Temperatura ºC	% ác. láctico	% ác. butírico
45	0,4	3,7
30	1,9	0,1
22	1,2	0,1

* Facilitar rápido contacto entre las bacterias y los carbohidratos; el picado o triturado de los forrajes permite la exclusión del aire y el contacto con las bacterias. El proceso se acelera.

* Contenido de humedad de los forrajes entre 60 y 75% asegura una alta concentración de azúcares fermentescibles, como por ejemplo 60% en sorgo, 70% en maíz y 75% en pasturas. Debajo de estos niveles se corre el riesgo de alcanzar altas temperaturas por mala compactación y expulsión del aire con la consiguiente pérdida de carbohidratos y digestibilidad de proteínas.

* Mantener en la masa un pH de 3 a 4, que asegura la permanencia del ácido láctico e impide la proliferación de otros organismos.

* Impedir la entrada de aire al silo una vez terminado el proceso, pues se crearía un ambiente favorable para el desarrollo de organismos butíricos.

Cultivos a ensilar

Dentro de la gran variedad de plantas aptas para ensilar, debemos señalar sus diferencias en cuanto a su disponibilidad en azúcares (cuadro 8):

Cuadro 8- Tenor en azúcares y proteínas en forrajes

Forraje	Carbohidratos	Proteínas
maíz o sorgo	elevado	muy bajo
gramíneas (pasturas)	alto	regular
gramíneas + leguminosas	mediano	mediano
leguminosas	muy bajo	elevado

Valores válidos cuando los cultivos se cosechan en el momento aconsejado para ensilar. El forraje a ensilar deberá contener elevado contenido de glúcidos y bajo de proteínas, ya que éstas al ser degradadas producen amonio que neutraliza al ácido láctico, restándole calidad al producto. El cuadro 9 muestra características de silos a partir de diferentes plantas.

Cuadro 9 - Características de los materiales iniciales y de los tres silos obtenidos

Forraje	Materia seca %	Proteína bruta %	Azúcares solubles %	Azúcares/ proteínas
alfalfa	24,4	25,2	3,9	0,15
sorgo	35,2	9,4	10,4	1,10
maíz	24,1	8,6	15,9	1,80

Silo	%M.S.	% Prot	% Azúcares	pH	ácidos % L	A	P	B
sorgo	34,7	8,5	2,8	4,2	1,8	0,6	0,0	0,0
maíz	22,4	10,2	3,8	3,9	1,7	0,6	0,0	0,0
alfalfa	21,2	16,7	1,3	5,7	0,0	1,1	0,5	1,9

ácidos: L=láctico, A=acético, P=propiónico, B=butírico

En el corte, maíz y sorgo presentan entre 30 y 40% de materia seca, que coincide con el estado fenológico de grano lechoso a grano pastoso y la producción de carbohidratos es elevada asegurando el desarrollo de microorganismos fermentadores.

Aditivos

Se recomienda el uso de estas sustancias cuando la escasez o el exceso de algún elemento en la planta hace insegura la conservación del silo, o cuando se desea mejorar el valor nutritivo, la apeticibilidad, o ambos. La correcta distribución de estas sustancias en toda la masa del silo asegura su eficacia.

Productos ricos en carbohidratos: se agregan a materiales pobres en ellos, como las leguminosas:

* **melaza**, subproducto de la refinería de la caña de azúcar, se presenta como un líquido oscuro, espeso, con olor característico que es muy empleada por su bajo costo. Se mezcla en partes iguales con agua y puede agregarse a la cosechadora que va regando el forraje (3-5% en peso), con este aditivo.

* **granos**: poseen almidón, poco empleado por la flora láctica hasta desdoblamiento enzimático en azúcares. Se aconseja más la harina de granos (70 a 100 kg/ton forraje).

* **suero de leche:** posee entre 4 y 5% de lactosa, pero los volúmenes a manejar son grandes (250 L/ton forraje). Se usan más sueros desecados (20-30 kg/ton)

* **papas, remolacha azucarera, desechos de frutas**, etc. son también empleados.

Conservadores: agregado de ácidos directamente al forraje hasta bajar su pH a menos de 4,0. **Método AIV**: se emplean 4 partes de ácido sulfúrico y 6 de ácido clorhídrico, que se mezcla en el momento de ensilar diluyendo en 5-6 veces su peso en agua. Se detiene la actividad de las células, que se marchitan y el desarrollo de microorganismos indeseables. Se usa en países nórdicos, muy fríos, donde cuesta establecer la fermentación.

Inhibidores: se agregan para evitar el desarrollo de organismos indeseables, como el SO_2 que es gas, metabisulfito de sodio, CO_2 al 1%.

Complementos: la sal común ha sido empleada como conservadora. Urea, sales orgánicas, etc.

Cultivos bacterianos en algunos países se **inoculan** los silos con productos comerciales con bacterias lácticas seleccionadas por su rápida producción de ácido. Si bien la microflora activa está presente en los vegetales, puede encontrarse en bajo número o las condiciones pueden no ser las óptimas. La inoculación puede acelerar el proceso.

La figura 7 esquematiza procesos tanto en la formación como en el deterioro de los silos. Al entrar aire se desarrollan microorganismos, sobretodo levaduras y hongos, que consumen el ácido láctico. El silo pierde la sustancia que lo estabiliza, el pH asciende y se consumen las otras sustancias nutritivas, proteínas, lípidos. Es importante evitar esto deterioros, manteniendo cubierto el forraje.

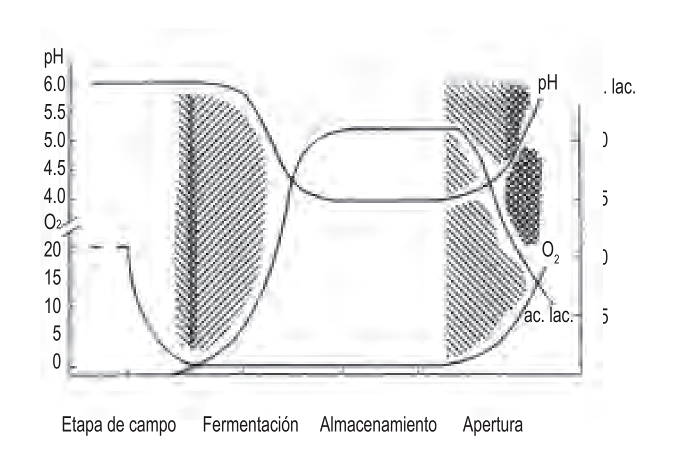


Figura 7- Principales cambios en el ensilaje y fases críticas en el deterioro aerobio y anaerobio según el pH, nivel de O_2 y concentración de ácido láctico

En resumen

La obtención de buenos ensilados puede lograrse si se toman en cuenta ciertas condiciones:

* cosechar en el momento oportuno

* no ensilar forrajes mojados por la lluvia

* picar o macerar el cultivo

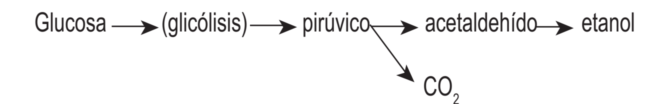
* extraer el aire

* agregar melazas en el ensilado de leguminosas

* marchitar los forrajes con alto contenido de humedad

* utilizar sales inorgánicas, inoculantes, otros aditivos, previamente evaluados.

Fermentación alcohólica



Los productos finales de la fermentaci6n alcohólica son etanol y CO_2 y es realizada por **levaduras** entre ellas la más conocida es *Saccharomyces cerevisiae*. Estas levaduras tienen más de un tipo metabólico, son aerobias y respiran en presencia de O_2, pero en condiciones anaerobias fermentan. Este tipo de levaduras soportan mayores concentraciones de alcohol que otros microorganismos. Por esto, la fermentación alcohólica se emplea en la conservación o producción de alimentos. El mecanismo de conservación se basa en la producción de alta concentración de alcohol no tolerado por la mayoría de los microorganismos, en especial los degradadores de la materia orgánica que deterioran el producto. El cuadro 10 muestra diferentes usos de estos microorganismos.

El proceso de fermentación alcohólica es empleado en:

* la elaboración de bebidas alcohólicas

* la producción de pan

* etanol: solvente, desinfectante y que se usa en muchos países como combustible

Cuadro 10 - Uso de las levaduras

Producción de células de levaduras: levadura del pan
levadura seca como alimento y suplemento proteico

Productos de las levaduras: extracto de levadura usado en medios de cultivo
vitaminas A y D, enzimas para la industria alimenticia (invertasa, galactosidasa)

Productos obtenidos por fermentación: etanol, glicerol

Bebidas alcohólicas: vino, cerveza

Bebidas destiladas: whisky, brandy, vodka, ron

Vinificación

El vino se produce por la fermentación alcohólica del mosto de uva y el microorganismo responsable es la levadura ***Saccharomyces cerevisiae*** (cuadro 11). La uva colectada debe tener un contenido adecuado de azúcar (160 a 180 g/L) para posibilitar un buen sustrato para la fermentación. En la superficie de las uvas existen levaduras salvajes que están naturalmente presentes, pero que no hay que dejar prosperar porque no producen buenas fermentaciones. Para eliminarlas se trata la superficie vegetal con sustancias como dióxido de azufre o metabisulfito de potasio. Luego de formado el mosto se le agrega el cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* aireando el contenido de la cuba para que la levadura se reproduzca rápidamente por respiración.

Luego se debe obtener la anaerobiosis dejando en reposo el contenido de la cuba, para que se produzca la fermentación. Se debe tener en cuenta el pH, temperatura y concentración de azúcar del medio, para posibilitar el buen trabajo de las levaduras. El alto contenido de alcohol y bajo pH, hacen al vino un medio inapropiado para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos pero a veces se puede alterar (cuadro 12). Pasteur fue el primero que describió estas alteraciones:

1. si el vino queda expuesto al aire pueden actuar levaduras no deseadas y bacterias que producen ácido acético transformando al vino en vinagre

2. si el vino se mantiene en condiciones de anaerobiosis pueden actuar bacterias lácticas que fermentan azúcares residuales produciendo mal gusto. Hay levaduras que pueden crecer en vinos dulces que no alteran el sabor pero enturbian el producto. Para prevenir las alteraciones se puede pasteurizar, pero este proceso disminuye la calidad, pues se alteran los azúcares y disminuye el contenido alcohólico. También se puede esterilizar el producto por filtración o agregando aditivos químicos (SO_2).

Cuadro 11- Características del mosto y del vino

Mosto	Vino
• glucosa	etanol (11%)
• fructosa (200g/L)	levaduras y azúcares < 2g/L
• pH = 3.0-3.8	pH 3,0-3,8
• ácidos tartárico y málico	ácidos, idem
• aa, NH_4^+, vitaminas	aminoácidos, amonio, vitaminas
• anaerobiosis	aromas, en mayor proporción

Cuadro 12 - Lista parcial de microorganismos involucrados en la producción y alteración de vino

Organismo	Rol en producción y/o alteración	Cambios
Saccharomyces cerevisiae var ellipsoideus	1. ferm.ólica primaria 2. carbonatación de vinos espumantes en fermentación secundaria 3. enturbiamiento en vinos dulces	glucosa y/o fructosa ⟶ etanol y CO_2
Pediococcus, Leuconostoc y Lactobacillus	fermentación maloláctica	I. ác.málico ➔ ác. láctico y CO_2 II. mejor sabor
Levaduras superficiales *Saccharomyces beticus*	pesado crecimiento superficial y producción de sabor a Jerez	I. etanol,acetaldehido II. sabores
Botrytris cineres	crecen en ciertas regiones, en superficie de uvas que dan vinos dulces	I. deseca la uva II. oxida málico a CO_2 y H_2O III. agrega color y sabor
Bacterias del ácido acético y levaduras superficiales	alteran vinos expuestos al aire	oxidan etanol a ác. acético
Bacterias lácticas *Lactobacillus trichodes*	alteran el vino anaeróbicamente	mal gusto

Elaboración de cerveza

Esta bebida se produce por fermentación de granos sin azúcares fermentables. El almidón debe ser hidrolizado a azúcares (maltosa y glucosa) antes de usarse como sustrato por las levaduras para su fermentación. Este proceso se llama **sacarificación**. Los granos usados pueden ser de cebada, arroz o maíz. Granos de arroz se usan en Asia, mientras que el maíz es utilizado en algunas regiones de América. Los granos más empleados son los de cebada.

La conversión de los granos de cebada en malta se denomina **malteado**: los granos se dejan germinar, luego son secados y molidos. La malta contiene amilasas que son las enzimas necesarias para degradar el almidón en azúcares fácilmente fermentables. Posteriormente se muele la malta y se deja hidrolizar su suspensión en agua. Algunos productos incluyen la hidrólisis de proteínas, entonces esta mezcla se somete a altas temperaturas para detener estos cambios enzimáticos y se filtra.

Agregado de lúpulo (inflorescencia del vegetal *Humulus lupus),* a la malta para impartirle el característico sabor amargo de la cerveza por la presencia de una resina soluble que además actúa previniendo el desarrollo de microorganismos no deseados.

Fermentación

La maltosa y la glucosa son fermentados por cepas seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae* conocidas como levaduras cerveceras. Este proceso se realiza a baja temperatura por espacio de 5 a 10 días produciéndose etanol y CO_2.

Maduración

Luego de la fermentación la cerveza se almacena a 0ºC y precipitan las proteínas, resinas y el líquido se aclara.

Enfermedades

Se pueden producir durante el proceso de fermentación, en la maduración y en el embotellamiento. Un agente nocivo muy común lo constituye la levadura salvaje *Saccharomyces pasteurianus* que provoca un sabor amargo y desagradable. Si la temperatura se hace demasiado alta durante el proceso de maduración y almacenamiento se desarrollan bacterias lácticas produciendo ácido láctico y enturbiamiento. Las enfermedades pueden evitarse por pasteurización o esterilización por filtración antes del embotellado.

Panificación

En la elaboración de pan se usan levaduras para leudar la masa. La levadura usada es *Saccharomyces cerevisiae* que por fermentación alcohólica de los azúcares produce etanol y dióxido de carbono. En el caso del pan lo que interesa es la producción de dióxido de carbono que hace que aumente el volumen de la masa, el alcohol se evapora en el horno.

Inóculos: se usan inóculos comerciales, levaduras producidas en gran escala, en sistemas aireados, donde el rendimiento energético es más alto que en la fermentación. Mediante centrifugado se elimina el líquido y se obtienen los *pellets* celulares a los que se les agrega aceites vegetales y se forman los panes de levadura. La levadura también se vende seca, en polvo.

Bibliografía

Frazier, W. C., D. C. Westhoff **Microbiología de los Alimentos,** 1985, Ed. Acribia, Barcelona

Frioni, L. **Procesos microbianos**. 1999 Fundación de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

Jonsson, A. The role of yeasts and clostridia in silage deterioration, 1989, Sveriges lantbruksuniversitet, Inst. för Mikrobiologi, Rapport 42, Uppsala: 1-51

Madigan, Martinko, Parker **Brock**, **Biología de los microorganismos**, 2000. Prentice Hall International

National Academy of Sciences, **Microbial processes: Promisiong Technologies for Developing Countries,** 1979, Washington DC

Peñagaricano, J. A. , W. Arias y N. J. Llaneza **Ensilaje**,1988, Ed. Hemisferio Sur

Prescott, Harley y Klein **Microbiología**, 1999, McGraw-Hill.Interamericana

Salminen, S. y A. von Wright, **Lactic Acid bacteria**, 1993, Marcel Dekker, New York

Varnam, A. H. The exploitation of microorganisms in the processing of dairy products. En : **Exploitation of Microorganisms,** 1993 D. Gareth Jones (ed), Chapman & Hall, London: 273-296

Preguntas de repaso

1) Concepto general del proceso de fermentación, rendimientos energéticos y en poder reductor de las principales fermentaciones.
2) Compare la fermentación homo y la heteroláctica
3) Ejemplos de aplicaciones biotecnológicas de la fermentación láctica
4) ¿Dónde puede obtener inóculos de bacterias lácticas? Y cómo se usan los comerciales?
5) Características de un buen ensilado.
6) ¿Por qué los medios de cultivo con extracto de levadura se denominan complejos?
7) Factores que hacen del vino un producto estable.

20 Aplicaciones industriales de los microorganismos

Los microorganismos son muy empleados en procesos vinculados a las industrias alimenticia, química, farmacéutica, en la elaboración de inoculantes para la agricultura y la protección del ambiente. El hombre, desde muy antiguo, aún sin reconocer la acción de los microorganismos se valió de ellos para conservar alimentos, como por ejemplo, mediante el empleo de las fermentaciones, especialmente la alcohólica, ya referidas en Egipto, 6.000 años AC. Pero cuando se emplean los microorganismos en microbiología industrial o biotecnología, se trabaja con el organismo o la comunidad seleccionada el que se propaga en un ambiente controlado.

El cuadro 1 resume la evolución de la aplicación de los microorganismos en **Biotecnología**: manipulación científica de procesos realizados por microorganismos y sus enzimas y en sentido más estricto, modernamente se designan con el mismo término a los procesos que involucran al ADN recombinante.

Se reconocen áreas en la Biotecnología:

i) producción de biomasa

ii) fermentaciones (procesos biológicos que ocurren en la oscuridad y no involucran cadenas respiratorias con O_2 o NO_3^- como aceptares de electrones)

iii) obtención de metabolitos secundarios de los microorganismos

iv) empleo de microorganismos genéticamente modificados (MGM)

Cuadro 1- Cronología del desarrollo de la Biotecnología

Etapa pre-Pasteur (anterior a 1865)
- ➢ Bebidas alcohólicas (cervezas, vinos)
- ➢ Productos lácteos (quesos, yogur)
- ➢ Vinagre

Etapa Pasteur (1865-1940)
- ➢ Fermentaciones Industriales (etanol, butanol, acetona, glicerol)
- ➢ Producción de ácidos orgánicos (acético, cítrico, láctico)

Etapa Antibióticos (1940-1960)
- ➢ Producción a gran escala de antibióticos
- ➢ Transformaciones de esteroles (cortisona, estrógenos)

Etapa post-antibióticos (1960-1975)
- ➢ Producción de: aminoácidos, enzimas industriales
- ➢ Enzimas inmovilizadas
- ➢ Proteína unicelular, polisacáridos

Etapa Biotecnología Molecular (1975-presente)
- ➢ Tecnología del ADN recombinante
- ➢ Primeros productos aparecen en el mercado en 1982 (vacunas, insulina humana)

Producción de biomasa

- fuente de energía renovable. Ej. Gasohol en Brasil
- producción de proteínas microbianas (*SCP=single cell protein)*

Ejemplos: *Candida lipolytica*, levadura que crece en hidrocarburos derivados del petróleo crudo y en hidrocarburos alifáticos de cadenas largas (C_{12}-C_{18})

Methylophilus methylotrophus, productor de metano a partir de gas natural o metanol

Fusarium graminarum, biomasa que se vende comercialmente

Fermentaciones

- aminoácidos, ácidos cítrico, acetona, enzimas, vitaminas

- alimentos: levaduras, polisacáridos, derivados de la leche

Metabolitos secundarios

- antibióticos: *Penicillum notatum* (penicilina), *Streptomyces* sp (estreptomicina), hongos (micotoxinas)

Ingeniería genética

- vacunas

- algunas hormonas (la insulina, se produce a partir de *E. coli* recombinante hiperacumuladora; hormona del crecimiento humano, interferones)

- agentes para el control de insectos: la proteína tóxica del *Bacillus thuringensis* (Bt) es introducida a vegetales

Microbiología industrial

Esta rama de la microbiología tiene por objeto la producción a gran escala de microorganismos de interés (biomasa microbiana), que serán empleados como inoculantes en la producción de vinos, cervezas, pan, derivados lácteos, etc., para la obtención de enzimas de interés, como celulasa, lipasas, Taq-polimerasa, enzima termolábil, empleada en la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*), de metabolitos de interés: aminoácidos, hormonas, vitaminas, antibióticos, etc. Los microorganismos se emplean también en el control de insectos y otras plagas, en la recuperación de metales y en el cuidado del ambiente (cuadro 2).

En sus comienzos la biotecnología, aplicó los métodos de selección, mutación e intercambio genético. Si bien este método se sigue empleando, en la biotecnología moderna estas técnicas se complementan con el empleo de la tecnología del ADN recombinante. Se puede, así, añadir nueva información genética a las células que se desee (vegetal, animal, microbiana) (cuadro 3).

Cuadro 2- Aplicaciones de los microorganismos

Enzimas: amilasas, glucosa isomerasa, proteasas

Aditivos para alimentos: aa (fenilalanina, lisina, glutamato monosódico), vitaminas (B_{12}, riboflavina), ácidos orgánios (ác. cítrico), nucleótidos, polisacáridos

Productos químicos comunes: citrato, ácido acético, etanol, solventes industriales, alcoholes y acetona, producidos por fermentación

Farmaceúticos: antibióticos (penicilina, estreptomicina), biopolímeros (fenoxialcanos), hormonas (por ingeniería genética las bacterias pueden producir insulina de uso humano), alcaloides

Productos agrícolas: utilización de inoculantes para: leguminosas, silos, viveros forestales, otros (control biológico de microorganismos fitopatógenos e insectos plaga, ej: *Bacillus thuringensis)*

Protección del ambiente: microorganismos naturales o modificados genéticamente en la biodegradación de polímeros, recuperación de metales (biorremediación)

Biocombustibles: metano, etanol, H_2, biodiesel

Cuadro 3- Cepas microbianas empleadas para procesos industriales

- cepas nativas seleccionadas en la naturaleza
- cepas de colección que se adquieren en estado liofilizado
- selección de mutantes espontáneas (resistentes a fagos, con propiedades aromáticas, etc.)
- organismos genéticamente modificadas (OGM) a los cuales se les integraron genes de interés en plásmidos, mediante técnicas de ingeniería genética

El cuadro 4 resume algunas de las propiedades que se les exige a un microorganismo que va a ser empleado en la industria.

Cuadro 4- Propiedades de microorganismos de uso industrial

- Disponible en cultivo puro
- Genéticamente estable
- No patógeno y libre de toxinas
- Crecimiento rápido en cultivo en gran escala con alto rendimiento del producto deseado
- Debe poder protegerse de la contaminación
- Crecer en medio de cultivo líquido y con sustratos de bajo costo
- Fácil recuperación del producto del medio de cultivo
- Susceptible a la manipulación genética

Los microorganismos seleccionados deben conservarse con el mantenimiento de las características deseadas (estabilidad). Las técnicas incluyen:

* transferencias o repiques periódicos (puede aumentar la tasa de mutaciones y la variación)

* cultivos en agar inclinado cubierto de aceite mineral, que evita desecación

* muchos microorganismos se pueden conservar en agar-agua o aun en medio de cultivo mínimo (los cultivos lavados pueden conservarse varios meses en heladera)

* congelación a -20 o -70ºC en medios con glicerol (50%) que evita daños en la célula

* deshidratación (los cultivos se secan en suelo estéril o en discos de papel de filtro y se pueden almacenar en desecador o congelarse).

Finalmente, los métodos más seguros incluyen :

- **liofilización** (se elimina el agua por ciclos de vacío y congelamiento en aparatos especiales), las células secas se conservan en ampollas cerradas
- **ultracongelación** (en nitrógeno líquido) a -196ºC.

Se informa de cultivos viables por estas últimas técnicas por más de 15 años.

Una vez seleccionado el microorganismo, éste debe ser cultivado de modo de obtener los productos deseados. Los microorganismos deben, en general, cultivarse en forma masiva, a los efectos de obtener gran cantidad de biomasa. Hay que destacar que el término **fermentación,** es empleado en forma más general en microbiología industrial y biotecnología. En efecto, se refiere con este término también a cualquier proceso aerobio o anaerobio que conduzca al cultivo masivo de microorganismos, a la descomposición de alimentos, a la producción de bebidas alcohólicas. Los reactores industriales y los equipos a escala de laboratorio con control de entrada y salida de nutrientes, de pH, aireación, etc. se denominan "fermentadores"(figura 1) (Prescott *et al.*, 1999), donde todos los procesos se realizan en condiciones de asepsia.

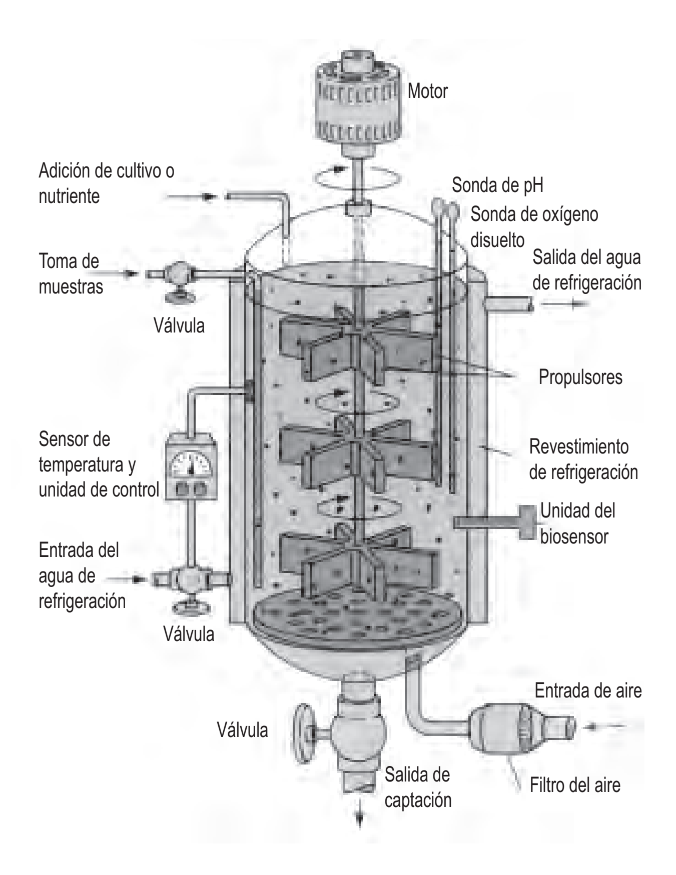


Figura 1- Fermentador para cultivos de microorganismos aerobios o anaerobios a gran escala

Metabolitos primarios y secundarios de los microorganismos

Metabolitos primarios: se producen durante la fase logarítmica de crecimiento como producto del metabolismo, y son esenciales para la función del microorganismo (aminoácidos, ácido pirúvico, etanol, ácido láctico). Su producción neta se relaciona con el crecimiento y la cantidad de sustrato. Esta etapa se denomina **trofofase**

Metabolitos secundarios: se producen en la fase temprana estacionaria de crecimiento y son productos finales de vías metabólicas complejas. No son críticos para la función de los microorganismos, como por ejemplo los antibióticos, pigmentos, hormonas, vitaminas, etc.

Esta etapa es conocida como **idiofase** (figura 2).

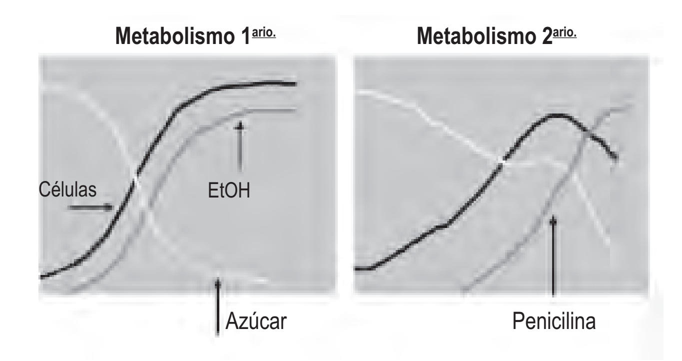


Figura 2- Cinética de la producción de metabolitos

La figura 3 esquematiza el proceso industrial de producción de un metabolito, partiendo de un cultivo microbiano debidamente seleccionado, el que se propaga por sucesivos cultivos, incrementando el tamaño del inóculo a introducir en el fermentador.

Los medios de cultivo empleados en la industria incluyen **materias primas de bajo costo:** melazas, sueros de leche, desechos agrícolas, glicerol, como fuentes de carbono y energía, harina de soja, amoníaco y sales de amonio o nitratos, como fuentes de nitrógeno, extractos de levadura o preparaciones sin refinar de vegetales como fuente de vitaminas, yeso o carbonatos o fosfatos usados como fertilizantes, como amortiguadores de pH, aceites vegetales o alcoholes de alta graduación como antiespumantes.

Las técnicas de cultivo continuo (capítulo 4), mejoran la producción de células y la velocidad de empleo del sustrato, ya que los microorganismos se mantienen en fase logarítimica continua.

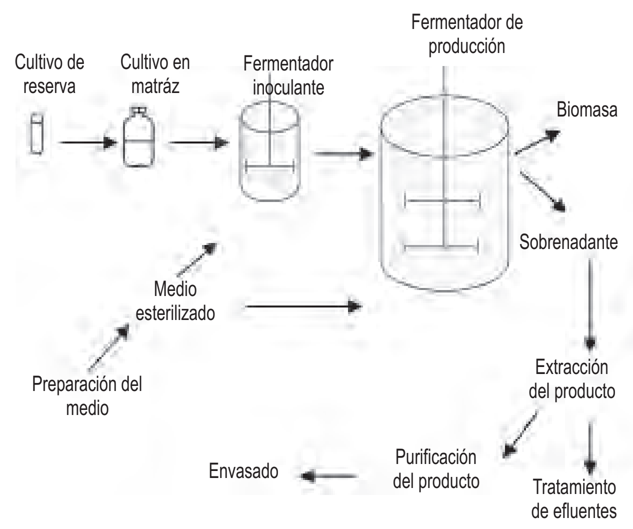


Figura 3- Proceso industrial de producción de un metabolito microbiano

El cuadro 5 resumen los pasos a seguir en la obtención de metabolitos microbianos por procesos aerobios o anaerobios.

Cuadro 5- Etapas en la obtención de metabolitos de interés en procesos aerobios o anaerobios

* preparación de medios de cultivo con sustratos accesibles y de bajo costo
* esterilización del equipo con el medio de cultivo
* preparación del inóculo y su propagación en el laboratorio (1/10 del volumen del reactor)
* inoculación y desarrollo controlado del microorganismos en el reactor
* extracción y purificación del producto: enzima, proteína, solvente, etc.
* tratamiento de los efluentes

A continuación analizaremos algunos de los grupos microbianos de interés para el hombre que tienen desarrollo industrial (cuadro 6). El tema Antibióticos es tratado en los capítulos 4, 14 y 17.

Cuadro 6- Procesos microbianos de interés

- levaduras: panificación, bebidas alcohólicas, etanol, vitaminas
- bacterias lácticas: inoculantes para alimentos, leche y derivados (yogur, queso, *pickles)*
- microorganismos como agentes probióticos: bacterias lácticas
- bacterias productoras de ácidos acético (vinagre), *Acetobacter, Gluconobacter*
- bacterias productoras de solventes: acetona, etanol, *Clostridium acetobutilicum*, *Propionibacterium*
- inoculantes para la agricultura: bacterias fijadoras de N_2 (*Rhizobium, Bradyrhizobium*, cianobacterias, *Frankia*), microorganismos para control biológico (*Pseudomonas*, *Thrichoderma*)
- microorganismos para producir proteínas unicelulares como alimento: levaduras, bacterias, algas (*Candida, Spirulina*)
- bioinsecticidas: *Bacillus thuringensis*
- microorganismos como fuente de aminoácidos, de vitaminas: vit B_{12}, riboflavina
- producción biológica de polisacáridos: dextranos *(Leuconostoc)*, xantanos (*Xanthomonas*)
- virus y bacterias para preparación de vacunas

Productos de las fermentaciones

La figura 4 muestra distintas vías metabólicas que a partir del piruvato realizan numerosos microorganismos heterótrofos (capítulo 3) y que conducen a la acumulación de productos que han sido históricamente importantes para el hombre:

* etanol, acetona, H_2, ácido láctico, cítrico, propiónico, butanodiol, ácidos orgánicos, etc.

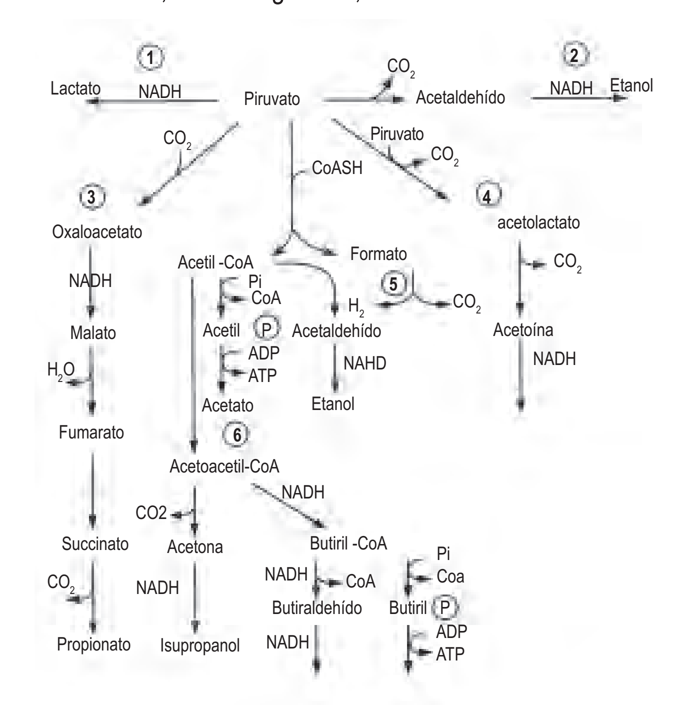


Figura 4- Diversidad de fermentaciones

Muchos de estos productos se continúan produciendo hoy día por vía fermentativa, a pesar de que su síntesis química permite su obtención en la industria, ya que el fácil aislamiento de los microorganismos responsables y el bajo costo de los sustratos y de la tecnología requerida hace que los procesos biológicos sean competitivos desde el punto de vista económico.

Las fermentaciones láctica y alcohólica son tratadas en el capítulo 19.

Se señalan a continuación algunos de los objetivos en la producción de bacterias lácticas y de las levaduras (cuadros 7 y 8), dos de los grupos microbianos con mayor incidencia en la alimentación humana.

Cuadro 7- Metabolitos producidos por las bacterias lácticas

- Productos principales: ácido láctico, CO_2, etanol, sustancias aromáticas
- Compuestos antimicrobianos: ácidos orgánicos, etanol, diacetilos, H_2O_2
- Bacteriocinas: péptidos que inhiben cepas muy relacionadas. Contra patógenos como *Bacillus, Clostridium, Staphylococcus*. Ej: la Nisina producida por *Lactococcus*, Acidofilina por *L. acidophilus* activa contra *E. coli, Salmonella panama*
- Texturizantes (exopolisacáridos): importantes evitando la separación del agua (yogur). *S. thermophilus* productora de 2 heteropolisacáridos con glucosa y galactosa
- Quimosina: esta importante enzima usada para la coagulación de la leche en la preparación de quesos se obtiene del estómago de terneros, pero en la actualidad se sintetiza a partir de numerosos microorganismos. Preparaciones comerciales a partir de *Lactococcus lactis, Saccharomyces cereviseae , Bacillus, Aspergillus niger,* se encuentran en desarrollo.

Cuadro 8- Importancia industrial de las levaduras

* Son los microorganismos más ampliamente utilizados en la industria

* Importancia económica:
  a) biomasa celular (para pan, cerveza, vino)
  b) componentes celulares (vitaminas, aminoácidos)
  c) productos finales de la fermentación (etanol, CO_2)

* El proceso de producción de material celular es aeróbico

* El proceso de fermentación alcohólica es anaeróbico

Probióticos

Se definen como: **alimentos suplementados con microorganismos viables que benefician al consumidor por mejoramiento del balance microbiano.** La FAO los define como "organismos vivos administrados en cantidades adecuadas que ejercen efectos benéficos en la salud del hospedante". Se consideran hospedantes a los animales (ganado vacuno, ovino, etc.) y el hombre. La mayoría de los probióticos son bacterias, aunque algunas levaduras, como *Saccharomyces boulardii* ha sido evaluada como probiótica.

Un producto de estas características debe ser ante todo seguro, efectivo y debe mantener su efectividad y potencialidad hasta su consumo (cuadro 9).

Cuadro 9- Criterios para selección de probióticos

* por su habilidad de sobrevivir en el tracto gastrointestinal

* por la producción de sustancias antimicrobianas

* rápido crecimiento: bajo tempo de generación (tg) o alta velocidad de crecimiento (vc)

* sin efecto patógeno y con habilidad para estabilizar la microflora nativa

* habilidad de sobrevivir a bajo pH y en la presencia de bilis

La mayoría de los productos contienen bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, a pesar de que otros géneros como *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Bacillus* y *Saccharomyces* (levadura) han sido comercializados como probióticas.

Existe controversia sobre si las bacterias usadas como iniciadoras en la preparación de yogur deben considerarse probióticas. *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptotoccus thermophilus* se usan para fermentar la leche y preparar el yogur (capítulo 19). Pero estos cultivos no son muy resistentes a las condiciones del estómago e intestino delgado y generalmente no alcanzan en alto número el tracto gastrointestinal, por lo que no pueden ejercer efecto probiótico. Sin embargo, estas bacterias, han incrementado la digestión de la lactosa en individuos carentes de lactasa y la respuesta inmune.

Rol de los probióticos en la salud

Por muchos años se aseguraba que los productos lácteos con cultivos vivos y activos, eran muy saludables. La investigación ha confirmado algunas de estas aseveraciones. Por ejemplo, la capacidad de algunas bacterias usadas en la dieta pueden mejorar la salud, como potenciar el sistema inmunitario. Algunas infecciones resisten-

tes a antibióticos, se convierten en serios problemas. La prevención de esas afecciones antes de que ocurran es la mejor alternativa y los probióticos constituyen una aproximación natural como barreras frente a las infecciones microbianas. También contribuyen a reducir el riesgo de ciertas enfermedades ocasionadas por diarreas y alergias en niños.

Cómo funcionan los probióticos

Los humanos, como todos los animales contienen muchos tipos y altos números de microorganismos en la piel, boca, tractos gastrointestinal y vaginal, En efecto, se ha considerado que existen más microorganismos asociados al cuerpo humano, del orden de 10^{14}, que de células propias (del orden de 10^{13}). Además del gran número de bacterias es necesario tener en cuenta su gran diversidad. Se estimó que más de 400 especies diferentes se encuentran en nuestro cuerpo.

Teniendo este hecho en consideración, no es sorprendente que los microorganismos hayan ejercido un importante rol en la salud humana. La mayoría de ellos no son patógenas y de hecho contribuyen positivamente al normal desarrollo. Pero algunas de estas bacterias pueden tener efectos negativos, por lo que resulta importante que el balance microbiano se mantenga a favor de las benéficas.

Se ha reconocido que individuos con una amplia flora intestinal de bacterias benéficas están en mejores condiciones para limitar el desarrollo de bacterias patógenas. Lactobacilos y bifidobacterias mantienen un balance saludable de la flora intestinal por la producción de compuestos orgánicos, como el ácido láctico, peróxido de hidrógeno y ácido acético, que incrementan la acidez del intestino e inhiben la reproducción de muchas bacterias perjudiciales. Estas bacterias probióticas también producen bacteriocinas, con efecto antibiótico.

Producción de levaduras a partir de derivados del petróleo

Por su rápido crecimiento, alto contenido proteico y capacidad para emplear sustratos carbonados de bajo costo, los microorganismos constituyen una importante fuente de alimento. Existe una industria basada en el cultivo de levaduras para uso como suplemento en alimento animal. Se usan levaduras estrictamente aerobias, como las del género *Candida* en lugar de las fermentativas, para lograr maximizar el crecimiento en condiciones de aireación forzada.

En general se buscan los sustratos más económicos, primeramente se emplearon **melazas** (sub producto de la refinación del azúcar) **y residuos de cosechas.** Actualmente se emplean derivados del petróleo, parafinas y moléculas de varios carbonos, adicionados de sales inorgánicas. Esta línea de elaboración de proteínas microbianas se denomina PP (producción de proteínas) y las plantas se instalan en las industrias petroleras, que abastecen con las fuentes de carbono.

Existen unidades industriales en países petroleros para el cultivo de *Candida lipolytica* en emulsión acuosa de petróleo crudo (la levadura puede oxidar hidrocarburos alifáticos de cadena larga, de C_{12} a C_{18}). El petróleo que queda es más fácilmente refinado.

Otro sustrato potencial es el gas **metano**, derivado de la industria petroquímica. Las velocidades de crecimiento son relativamente lentas en las bacterias oxidantes del metano y tienen tendencia a acumular mucílagos extracelulares.

Otro microorganismos muy empleado como suplemento proteico es la cianobacteria *Spirulina,* que es empleada como alimento en Africa y se vende en polvo o en forma de pastel seco en comercios de alimentos de Estados Unidos de América.

Producción de aminoácidos específicos

Las proteínas sintetizadas por los microorganismos son deficientes en ciertos aminoácidos requeridos por |os mamíferos. Las proteínas vegetales carecen también de estas sustancias: la de trigo es baja en **lisina,** la de arroz, en lisina y **treonina.** La suplementación con estos aminoácidos es práctica corriente y la producción microbiana de aminoácidos específicos ha sido muy estudiada. Muchas cepas microbianas o sus mutantes son defectivas

en los mecanismos de regulación de los metabolismos específicos de biosíntesis y por lo tanto, excretan grandes cantidades de algunos aminoácidos al medio. Este ejemplo constituye una importante aplicación de un proceso microbiano.

Uso de bacterias del ácido acético

Es conocida la acidificación que sufren bebidas alcohólicas expuestas al aire. Se oxida el etanol a ácido acético, por bacterias estrictamente aerobias. De aquí deriva la industria del vinagre, que permanece bastante empírica, la conversión lleva varias semanas y la limitante del proceso es la lenta difusión del aire en el líquido (gruesa película superficial de bacterias), se airea y regula la temperatura pero no es microbiológicamente controlado. Actualmente se produce vinagre en grandes fermentadores con circulación de líquido y aireación.

Esta oxidación es un ejemplo de respiración aerobia incompleta, realizada por representantes de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, que no presentan las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos funcionales, de modo que se acumula acetil-coA y ácido acético.

Otras bacterias con defectos enzimáticos que no les permiten completar las fermentaciones o respiraciones, son muy usadas en industria, en efecto, el ácido glucurónico (uso farmacéutico) se produce por oxidación de la glucosa por bacterias acéticas. Muchos azúcares alcoholes son convertidos en los azúcares por estas bacterias (sorbosa del sorbitol).

Los hongos comestibles

Varias clases de hongos se emplean como fuentes de alimento humano, de los cuales los más importantes son las setas, grandes cuerpos de fructificación de hongos filamentosos. Durante la mayor parte de su ciclo de vida, las setas o champiñones como se les denomina a los hongos comestibles crecen en forma de micelio en suelo, mantillos, vegetales en descomposición, pero cuando las condiciones son favorables, por la humedad, temperatura, desarrollan los cuerpos de fructificación, visibles a simple vista si son externos (hongos de sombrero) o subterráneos, como los hipogeos, globulosos, como las trufas. Estos hongos son cosechados, produciéndose sucesivos ciclos sobre sustratos lignocelulósicos (rastrojos, maderas) complementados con nutrientes. No se emplean medios ricos para evitar el desarrollo de hongos contaminantes saprofitas.

Hongos hipógeos globulosos como las trufas, son muy codiciadas por su sabor y aroma particular, pero su cultivo requiere suelos alcalinos y están muy asociados a las encinas, en España.

Muchos de estos hongos son además ectomicorrícicos, de modo que el productor forestal los recoge en la vecindad de los árboles, como pino, eucalipto, roble.

El cuadro 10 resume la composición química de dos hongos comestibles. Se aprecia que no son ricos en proteínas, pero por su buen sabor, minerales, bajo tenor graso, han sido incorporados al régimen alimenticio en los últimos tiempos.

Cuadro 10- Componentes nutricionales en algunos hongos

	***Agaricus* sp mg (%)**	***Pleurotus* sp mg (%)**
calorías	24	27
grasa	0	0
sodio	0	0
hidratos de carbono	15,5%	3,2%
fibra	0mg	0mg
proteinas	2,4%	3,2%
vitA	0%	menos 2%
vitC	2,4%	2%
Ca	0%	menos 2%
Fe	2,4%	menos 2%

Aislamiento, propagación de hongos comestibles

El aislamiento puede ser:

directo (esporas, micelio, carpóforos

indirecto (empleo de cámaras húmedas

Los medios de cultivo empleados son:
(líquidos y sólidos
(sintéticos, semisintéticos, naturales

El hongo más cultivado es sin duda el *Agaricus bisporus*, cuyo inóculo se propaga en botellas con medio rico en sustancias orgánicas, en general con semillas que facilitan la adhesión del micelio a superficies y liberan además sustratos orgánicos.

La propagación se realiza en lugares apropiados, tipo sótanos o galpones oscuros y con control de humedad y temperatura. La cama de siembra consiste, en general, en materiales como pajas, con suelo, estiércol. Pueden usarse grandes bolsas de plástico, colgadas en forma vertical. Luego de varias semanas comienzan a verse los cuerpos fructíferos, que se colectan y conservan frescos hasta su envío al mercado.

Otro hongo muy empleado es el *Lentinus edulus*, conocido como *shiitake* (figura 5). Es un hongo degradador de celulosa que se cultiva en troncos humedecidos o sobre aserrín. El inóculo se deposita en pequeños orificios de la madera y aproximadamente luego de un año, produce las fructificaciones, más sabrosas que las de *Agaricus* y de mayor precio.

Otro hongo de fácil propagación son las numerosas variantes de *Pleurotus*, típico hongo de sombrero de color pardo, gris, amarillo y rosado.

La figura 6 esquematiza el cultivo de hongos comestibles. Los cultivos se adquieren en forma de micelio, el que se conserva en frascos con granos y medio de cultivo. El micelio se propaga intensamente alrededor de los granos aprovechando liberación de sustancias orgánicas.

El cultivo puede realizarse en distintos dispositivos, como estanterías con cama de materiales ligno-celulósicos (pajas, aserrín, madera), o en bolsas de plástico colgadas a la sombra, a las cuales se les efectúan orificios a los efectos de que salgan al exterior los carpóforos y se puedan cosechar.

El ambiente se mantiene a una humedad adecuada, sin luz directa.



Figura 5- Hongos comestibles: *Lentinus edulus*, shiitaki (izquierda) y *Agaricus bisporus* (derecha)



Figura 6- Esquema en la producción de hongos comestibles

Otros microorganismos con interés industrial

Bacilos Gram positivos

Numerosas especies de bacilos Gram positivos son empleados por el hombre. Los aerobios o anaerobios facultativos del género *Bacillus* son importantes productores de enzimas (hidrolasas, lipasas) muy empleadas en la industria en productos para quitar manchas en la ropa, para

destapar cañerías, etc. Otros producen antibióticos y algunos son reconocidos en el control biológico de enfermedades vegetales y como bioinsecticidas.

Clostridium, con numerosos representantes anaerobios que incluyen especies benéficas, fijadoras de N_2, por ejemplo y otros patógenos como *C. tetanii, C. botulinicum,* etc. (cuadro 10 y figura 7)

Cuadro 10- Características de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*

Aerobios o facultativos **Ej. *Bacillus***	**Anaerobios** **Ej. *Clostridium***
Endosporas resistentes	Endosporas, resistentes a temperatura, desecación, radiaciones
Son anaerobios facultativos	Común en suelos
B. anthracis patógeno a humanos y animales	Producen poderosas toxinas
B. subtilis y B. polymyxa productores de antibióticos	Causantes de tétanos, botulismo, gangrena gaseosa
B. thuringiensis control biológico de insectos	Se usan para producir butanol por fermentación
Biodegradadores, producción de enzimas	Algunos fijan N_2
Muchas especies son productoras de enzimas de interés: hidrolasas, lipasas	



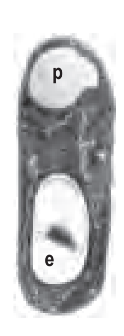


Figura 7- Izquierda**: *Clostridium* spp.** Nótese dos mecanismos de resistencia: endosporas terminales y cápsula. Coloración negativa, cultivo líquido en gota de tinta china. Derecha: ***Bacillus thuringensis*** con espora (e) y vecina a ella, la proteína tóxica (p).

El cuadro 11 esquematiza otra importante función de especies de *Bacillus*, que es la lucha biológica, en este caso contra larvas de insectos, sensibles a una poderosa toxina que se sintetiza junto a la espora bacteriana. Se ha logrado clonar este péptido y se ha incluido en vegetales, que se convierten en resistentes a insectos (arroz, maíz, etc. Bt, que presenta incluido genes con efecto insecticida).

Cuadro11- Insecticidas microbianos

Bacillus popillae y *Bacillus thuringiensis*

Esporulados, flagelos perítricos

Producen toxinas y un cuerpo paraesporal: proteína tóxica que en el intestino de los insectos produce parálisis de las larvas

Se utilizan como esporas muertas por calor en cultivos vegetales

Actinomicetes

Las bacterias verdaderas se diferencian marcadamente de los hongos filamentosos. Los actinomicetes se encuentran entre ambos grupos, aunque pertenecen formalmente a las bacterias, al orden *Actinomycetales* y son organismos Gram positivos, de estructura vegetativa de tipo miceliar desarrollo confinado sólo a bacterias Gram positivas. Algunos de estos organismos, los **Euactinomicetes**, se desarrollan sólo en estado miceliar, reproduciéndose por formación de esporas unicelulares diferenciadas en el extremo de la hifa.

En un segundo grupo, el de los **Proactinomicetes**, el desarrollo miceliar es transitorio, no se producen esporas y la reproducción ocurre primariamente por fragmentacióm miceliar en células cortas de tipo bacilar.

Los euactinomicetes: los ambientes naturales contienen una gran población, que se agrupan en pocas familias (figura 8).

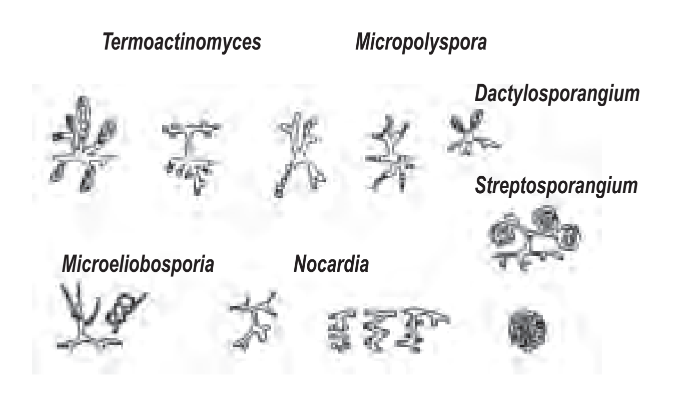


Figura 8 - Principales grupos de actinomicetes

1. ***Streptomycetaceae*:** las hifas usualmente fragmentan, micelio aéreo extensivo y cadenas de esporas con 5-50 o más conidios por cadena. Géneros típicos: *Streptomyces, Microellobosporia, Sporichthya*.

2. ***Nocardiaceae*:** hifas típicamente fragmentadas para dar pequeñas esporas.

3. ***Micromonosporaceae***: hifas que no se fragmentan, los conidios se presentan solos, en pares, o en cortas cadenas. Géneros: *Micromonospora, Microbispora, Micropolyspora, Thermomonospora, Thermoactinomyces, Actinobifida*.

4. ***Actinoplanaceae*:** esporas en esporangios, diámetro de la hifa 0,2- 2 mu. Géneros: *Streptosporangium, Actinoplanes, Planibispora, Dactylosporangium.*

5. ***Dermatophilaceae*:** los fragmentos de hifas se dividen para dar gran número de estructuras redondas, móviles. Género: *Geodermatophilus.*

6. ***Frankiaceae***: habitan nódulos radicales en ciertas no-leguminosas. Se han logrado reproducir fuera del huésped. Género: *Frankia*

7. ***Actinomycetaceae*:** no forman verdadero micelio, comúnmente anaerobias facultativas. Género: *Actinomyces.*

De los numerosos géneros de euactinomicetes, el más amplio es *Streptomyces*, que pueden representar más del 70-90% de las colonias desarrolladas en medio sólido. Son muy abundantes en el suelo, al cual le confieren el olor característico a tierra húmeda, atribuible a sustancias volátiles que producen. Este grupo ha adquirido importancia económica, por el gran número de antibióticos formados como metabolitos secundarios. Las esporas tienen rol reproductivo y son diseminadas por el aire o el agua. *Thermoactinomyces* produce esporas extremadamente resistentes al calor, similares a las endosporas de las bacterias típicas y la temperatura máxima de crecimiento es de 65-68ºC. Son activos en compostajes (capítulo 21), o abonos.

Los representantes del género *Frankia* se asocian simbióticamente a especies de no-leguminosas (capítulos 11 y 15).

Actividades y ecología

- la densidad de este grupo en el suelo es por lo general de 3 a 15 veces menor que la de las bacterias, dominando sobre todo los géneros *Streptomyces y Nocardia* (Dommergues, Mangenot, 1970)
- la mayoría de las especies son **mesófilas** (óptimo 25-30ºC, aunque hay especies termófilas
- abundan en suelos de **pH 6,8-8,0** y sólo excepcionalmente en suelos de pH inferior a 5,0. Esta sensibilidad a pH ácidos es empleada en el control de organismos fitopatógenos
- si la humedad es abundante y la temperatura no muy elevada, se los encuentra en forma **vegetativa**
- en condiciones extremas de desecación y/o altas temperaturas, dominan en forma de **conidios**
- dominan en suelos alcalinos
- disminuyen con la profundidad, aunque el porcentaje de actinomicetes en relación a la microflora total aumenta con la profundidad y constituyen gran proporción de la población en horizontes inferiores
- disminuyen con la inundación (la mayoría son aerobios)
- por su capacidad para sobrevivir en condiciones desfavorables, constituyen uno de los grupos más distribuidos en los suelos

Funciones

- **Degradación de compuestos resistentes**: responden al agregado de materiales carbonados varias semanas más tarde, pues son débiles competidores frente a bacterias y

hongos, cuando abundan los compuestos simples. Su participación aumenta cuando quedan materiales resistentes

- **Formación de humus:** muchas especies producen en medio de cultivo moléculas complejas, a las que se presume muy importantes en la humificación
- **Transformaciones a altas temperaturas:** sobre todo en la podredumbre y calentamiento de abonos verdes, heno, *compost*, abonos animales. Los termófilos son el grupo dominante y las superficies de los *compost* toman color blanco o gris típico de este grupo
- **Enfermedades en vegetales**: como la podredumbre negra de la papa y la viruela de la batata, por *Streptomyces scabies y Streptomyces ipomoeae*, respectivamente (figura 9)
- **Infecciones en el hombre y animales:** por ejemplo, por *Nocardia asteroides y Nocardia otitidis-caviarum*
- **Antagonismos microbianos**: síntesis de antibióticos, enzimas líticas (quitinasas, celulasas, hidrolasas)
- **Producción de sustancias probióticas**, como vitaminas (B_1, B_2, B_6, B_{12}, biotina, ácido fólico)
- **Fijación biológica de N_2:** el género *Frankia* es empleado en algunos países como inoculante de plántulas actinorrícicas en viveros (capítulo 15 y Anexo práctico).

Estas bacterias, tienen importantes aplicaciones biotecnológicas, ya que son grandes productores de sustancias bióticas (vitaminas) y antibióticas. La figura 9 muestra las esporas y los filamentos de especies del género *Streptomyces:*




Figura 9- *Streptomyces*, nótese el micelio fragmentado en esporas (izquierda) y tubérculo de papa infectado (derecha)

Bacilos Gram negativos

Numerosos representantes de estos organismos son benéficos para el hombre. Otras, como integrantes de la flora intestinal (enterobacterias), pueden, en ciertas condiciones transformarse en patógenas.

Agrobacterium

El género comprende organismos que producen tumores en vegetales. *A. tumefaciens* posee un plásmido Ti responsable de la virulencia. Se han construido vectores de transferencia generalizado para plantas (figura 10) (Prescott *et al.*, 1999). *A. rhizogenes* ha sido reclasificada actualmente con los rhizobios, por la similitud genética observada en los análisis de fragmentos de ARN y ADN.

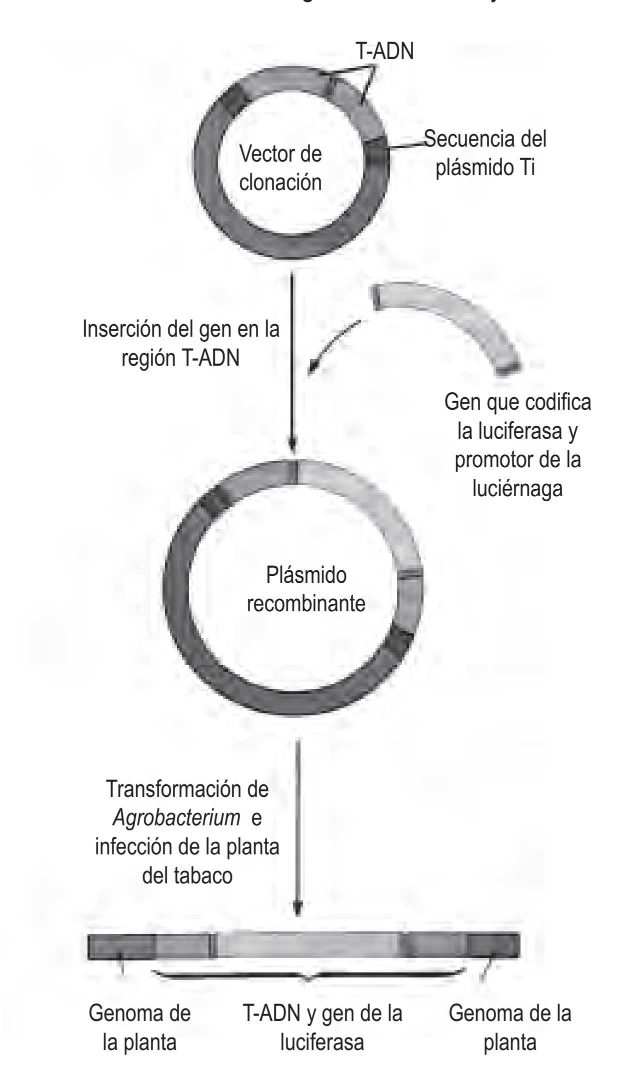


Figura 10- Transferencia de genes empleando *Agrobacterium*

Rhizobios

Esta bacteria, responsable de la introducción de nitrógeno a ecosistemas agrícolas y acuáticos, es analizada en los capítulos 11 y 15. En biotecnología son empleados por la gran producción de exopolisacáridos (EPS) y de fenoxialcanos (ácido poli ß OH butírico) empleados como plásticos biodegradables (figura 11). Son bacilos móviles, no forman esporas y fijan N_2 en simbiosis con vegetales. Una de las principales industrias vinculadas con la agronomía es la de los inoculantes para leguminosas que incluyen cultivos seleccionados de rhizobio (Anexo práctico).

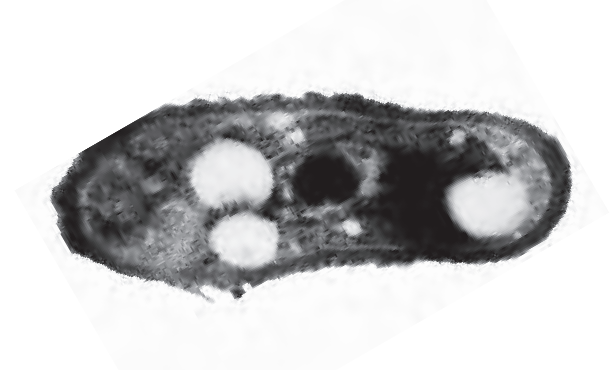


Figura 11- Célula de rhizobio mostrando los gránulos de ácido poli ß OH butírico (claros a los electrones)

Pseudomonas

Género de bacilos Gram negativos con numerosas especies, muchas de ellas con importante aplicación biotecnológica. Inoculantes de cepas seleccionadas son introducidas al suelo como inoculantes de semillas ya que actúan como agentes de biocontrol (producen antibióticos, sideróforos, compiten por nutrientes) contra otras bacterias y hongos y en prácticas de bioremediación, por su capacidad biodegradante. Otras producen desnitrificación (*P. fluorescens, P. aeruginosa)*, enfermedades en plantas (*P. syringae)* y en animales.

Uso de microorganismos para remoción de metales pesados de ecosistemas

Otra aplicación de los microorganismos es la recuperación de metales a partir de minerales y desechos de minas. La biolixiviación es realizada por poblaciones nativas de *Thiobacillus thiooxidans* que pueden recuperar hasta un 70% del cobre de minerales con bajo nivel en el metal. Se produce la oxidación biológica del cobre para producir sulfato de cobre soluble, que puede recuperarse al reaccionar esta solución de lixiviación, con hasta 3,0g/L de cobre soluble, con hierro. Se forma sulfato de hierro y el cobre se reduce a la forma elemental, que precipita y se recoge:

$$CuSO_4 + Fe^o \longrightarrow Cu^o + SO_4Fe$$

Puede haber necesidad de agregar otros nutrientes como P, N, micronutrientes para complementar la nutrición microbiana.

En la misma forma se recupera el mercurio.

Otra de las formas de recuperar minerales consiste en emplear células microbianas cultivadas previamente, como es e caso de ciertas algas, para concentrar metales preciosos, como la plata o el oro, presentes en baja concentración en minerales o contenidos en el agua. La figura 12 (Prescott *et al*., 1999) es una microfotografía electrónica de la recuperación de oro a partir de un chorro de lavado por células de *Chlorella vulgaris*. Los depósitos de oro (manchas negras) están asociados a las células del alga.

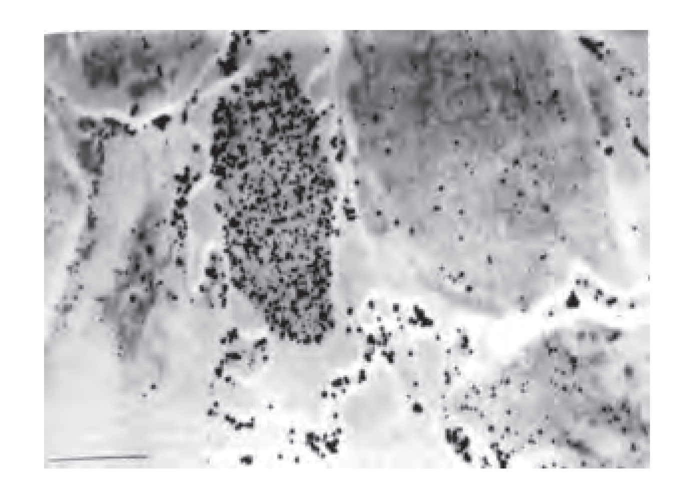


Figura 12- Recuperación de metales (oro) por células de un alga

Estos microorganismos promueven la bioprecipitación ej: biomineralización y/o cristalización por precipitación de metales en la superficie celular. Este fenómeno se puede deber a la síntesis y secreción de exopolímeros (EPS, proteínas). Contienen plásmidos de resistencia a Cd, Co, Cr, Cu, Pb, Hg, Ni y Zn. Bacterias como ***Ralstonia eutropha*** y ***P. mendocina***, son resistentes a los metales pesados por la presencia de un sistema de eflujo eficiente.

Uso de los microorganismos y sus productos en bioensayos

- dosificaciones(antibióticos, vitaminas, aminoácidos)
- biosensores (gases, demanda biológica de O_2, vitaminas)

Dosificaciones: cuando las concentraciones de ciertos productos químicos como los antibióticos son muy bajas como para detectarlos por métodos químicos se emplean los microorganismos. Por ejemplo se determina la dosis letal mínima de un antimicrobiano, como un antibiótico, capaz de inhibir el desarrollo de un microorganismo elegido como *test,* como el *Staphylococcus aureus*, en ensayos en medio líquido. La sustancia química se diluye seriadamente y a cada dilución se le agrega el mismo inóculo de la bacteria de referencia. Se considera dosis letal mínima (DLM) a la mayor dilución que provoca muerte del microorganismo (capítulo 4).

Biosensores, en este nuevo campo de la bioelectrónica, los microorganismos vivos o sus enzimas se unen con electrodos y la acción de estos biosensores convierte las reacciones biológicas en corrientes eléctricas. Se emplean mucho en medicina, en análisis en la agricultura, en la detección de contaminación en aguas, en el control de gases y líquidos industriales, en la medida de gases tóxicos en las minas. Con su desarrollo se alcanzará a detectar patógenos, toxinas, proteínas y ADN.

Bibliografía

Dommergues, Y., Mangenot, F. **Ecologie microbienne du sol.** 1970, Masson & Cie., París

Madigan, Martinko, Parker, **Brock, Biología de los microorganismos**, 2000. Prentice Hall International

Prescott, Harley y Klein, **Microbiología,** 1999, McGraw-Hill.Interamericana

Hongos comestibles: www.attra.ncat.org/attra-pub.PDF/mushroom.pdf. 24pag.

Preguntas de repaso

1) Señale las condiciones más económicas para producir proteínas de origen microbiano
2) ¿Cual sería el uso a darle a estos productos?
3) Señale dos productos importantes empleados en la dieta diaria del hombre producidos por vía biológica. Compare el proceso con alternativas químicas de síntesis
4) ¿Cómo procedería a la búsqueda de nuevos antibióticos?
5) ¿Por qué estas sustancias van perdiendo eficiencia?
6) Indique dos microorganismos de importante uso en la agricultura
7) ¿Por qué *Agrobacterium* es un género con muchas especies de interés en ingeniería genética?
8) ¿Cómo propagaría a gran escala hongos para ser empleados como: i) comestibles y ii) micorrícicos. Puede alguna especie coincidir en ambas funciones? Señale algunas
9) ¿Qué condiciones son necesarias para la producción más eficiente de hongos comestibles?
10) ¿Por qué los microorganismos son muy usados en la dosificación de sustancias presentes en la naturaleza, en el torrente sanguíneo o en soluciones? Cual es el fundamento del método?
11) Ejemplos de especies de *Clostridium* muy patógenos.
12) Resuma algunas de las funciones por las cuales los microorganismos son empleados a nivel industrial
13) Señale algunos de los alimentos producidos por fermentaciones y los sustratos originales.

Los microorganismos y la protección ambiental

21 Biotransformación de residuos orgánicos

La lenta descomposición de materiales biológicos tiene lugar en la naturaleza desde los comienzos de la vida. Sin la presencia de estos procesos microbiológicos naturales se hubiera hecho imposible la continuación de la misma, dada la creciente acumulación de materiales con carácter tóxico y contaminante.

Actualmente la crisis en la disponibilidad de alimentos, la escasez de combustibles y la agudización de la polución ambiental han conducido a que numerosos residuos de la agricultura, agroindustrias (lecherías, queserías), actividad forestal, industrias, animales o el hombre, deban ser tratados para reciclarlos y obtener alimentos, forraje, energía, fertilizantes, sustancias químicas.

Estos aspectos ambientales del ciclo terrestre del carbono han preocupado mucho a gobiernos e investigadores desde la década del 60 por la necesidad de resolver problemas creados por actividades incorrectas en el pasado. Los estudios se han enfocado sobretodo en los problemas derivados de la acumulación de desechos orgánicos e inorgánicos en los suelos y causes de agua, la acumulación de productos químicos sintéticos, la acumulación de materia orgánica y su contribución al CO_2 atmosférico y la producción de sustancias tóxicas para el hombre.

El cuadro 1 muestra la composición de los residuos orgánicos más comunes producidos cada año a partir de actividades domésticas, residuos urbanos sólidos y líquidos, producción animal, industrias de alimentos, aserraderos y gran variedad de industrias orgánicas. Estos desechos no constituyen un problema ambiental solamente en las ciudades, en efecto, la agricultura intensiva es fuente importante de desechos orgánicos.

Stevenson y Cole (1999) señalan que en los estados Unidos, los animales de granja acumulan 10 veces más residuos orgánicos que los habitantes y que una vaca o 7 aves generan 16 veces más residuos en relación a los de un hombre.

Cuadro 1- Constituyentes de los residuos

- Grasas, aceites, resinas, terpenos
- Carbohidratos: azúcares, almidón, hemicelulosa, celulosa, poliurónidos
- Ácidos orgánicos
- Aldehídos, cetonas, alcoholes
- Lignina
- Compuestos cíclicos: fenoles, quinonas, taninos
- Alcaloides y bases orgánicas
- Proteínas, aminoácidos, aminas, otros compuestos nitrogenados
- Enzimas, hormonas, vitaminas, pigmentos, sustancias antibióticas
- Constituyentes minerales: fosfatos, sulfatos, carbonatos, clorados, nitratos, sales de K, Na, Ca, Mg y microelementos

Muchos residuos orgánicos constituyen fuentes potenciales de nutrientes para los vegetales (N, P, K), pueden contribuir positivamente a la calidad de los suelos, mejorar su estructura, de modo que su empleo como abonos orgánicos resulta una práctica útil para la sociedad por su bajo costo, estimulación de la fertilidad y producción agrícola y mejora de la calidad de las aguas, evitando su vertido en las mismas.

Muchos residuos orgánicos (estiércol, residuos de cosechas, abonos animales, aguas servidas), se emplean directamente como abonos en el suelo, pero se señalan numerosas limitaciones a esta práctica que se resumen:

* Son en general fertilizantes de baja concentración en N, P, K, etc. , de composición variable, con alto contenido de agua. Los gastos de transporte son en general, superiores a su valor como fertilizante. La aplicación debe separase de la siembra a los efectos de permitir la eliminación del exceso de agua del abono.

* La concentración de nutrientes, sales solubles, micronutrientes y agua varía mucho de un lugar a otro y raramente son analizados antes de su empleo. Resulta difícil recomendar una dosis correcta.

* Las sales solubles pueden causar problemas de lavado de nitratos hacia aguas subsuperficiales, sobretodo en cultivos irrigados,

* Muchos residuos pueden contener metales pesados y/o compuestos orgánicos sintéticos que pueden acumularse en los suelos a niveles tóxicos para los vegetales. Muchos vegetales no sufren daños visibles pero acumulan estas sustancias tóxicas en sus tejidos y se convierten en peligro para el consumo humano. Las aplicaciones repetidas de abonos orgánicos y aguas servidas al suelo pueden incrementar los niveles de As, Cd, Cr, Hg, Mo, Pb, Ni, Se y Zn. Muchos están ligados a la materia orgánica y son liberados a formas asimilables a medida que el restos es degradado en períodos de varios años. Existen diferencias entre países sobre los niveles aceptables de metales tóxicos en los productos aplicados al suelo.

* Residuos de la producción avícola y animales no rumiantes contienen bacterias, virus y otros patógenos peligrosos para la salud humana cuando entran en la cadena alimenticia. La mayoría de ellos muere cuando los restos o aguas son pretratadas en lagunas u oxidadas biológicamente. *E. coli,* habitante normal del intestino humano es una bacteria indicadora de la calidad de los residuos y aguas, ya que no se encuentra en general en residuos pretratados. Su población en aguas tratadas, en compostajes, debe ser menor a 1000 organismos/g o por mL para que el material se considere apto para su aplicación.

* Los olores y otros inconvenientes crean conflictos entre los productores y la población que se resiste muchas veces a reconocer que los riesgos pueden minimizarse en sistemas de manejo apropiados.

* Finalmente, debe requerirse un monitoreo de la calidad de los cultivos y del agua por parte de agencias de protección ambiental. Este requerimiento agrega un costo adicional a la producción y no está disponible en muchos países. La polución potencial de un resto orgánico en los causes de agua se expresa usualmente en términos de:

DBO= demanda biológica de oxígeno, la cantidad de O_2 consumido por oxidación microbiana en 5 días de incubación. Esta medida informa sobre la concentración de compuestos orgánicos rápidamente degradables y formas reducidas de N y S (NH_3 y HS^-)

DQO= demanda química de oxígeno, es una medida de las sustancias orgánicas e inorgánicas oxidables totales que se estima por oxidación química con solución de dicromato de potasio y ácido sulfúrico. Es menos empleada que la DBO.

Si un residuo orgánico con alta DBO se introduce en el agua en gran cantidad, el contenido de O_2 de la misma se reducirá a niveles que impedirán la vida de los peces (requieren unos 5mg/L de O_2 disuelto para sobrevivir) y otros organismos acuáticos.

Aguas con valores de DBO de 1mg/L (1mg/L de O_2 se consumen en 5 días de incubación) se consideran de alta calidad, valores de DBO de 5 indican pureza dudosa. Se considera inadecuada la entrada de corrientes de agua a arroyos o ríos con una DBO de más de 20mg/L. La DBO de los residuos animales y la de los efluentes de la industria de procesamiento de alimentos es muy alta (más de 10.000 en tambos) y ejercen efectos muy perjudiciales en la comunidad acuática y en la calidad del agua.

Los tratamientos previos a que somete estos productos (compostaje, biodegradación anaerobia, etc.) bajan considerablemente estos valores ya que la degradación de la fracción más fácilmente atacada estabiliza a estos residuos.

Sin embargo, a pesar de estas consideraciones, en muchos establecimientos rurales se aplican los abonos orgánicos y residuos de agroindustrias directamente en el suelo. Se recomienda tener en cuenta:

- incrementar de la calidad de los abonos orgánicos para hacerlos más competitivos en relación a los fertilizantes químicos, por un adecuado control de calidad, disminución en la concentración de sales y elementos traza en las raciones, mejorar la presentación física de los mismos.

- efectuar recomendaciones adecuadas a los productores para su aplicación correcta

El cuadro 2 (publicado por Stevenson y Cole, 1999) muestra el contenido promedio de nutrientes en estiércol de 23 establecimientos de cría de ganado (la humedad varió entre 21 y 54%).

Cuadro 2- Nutrientes en estiércol de ganado vacuno

Nutriente	Rango	%	kg/ton
N	1,16-1,96	1,34	13,4
P	0,32-0,85	0,53	5,3
K	0,75-2,35	1,50	15
Na	0,29-1,43	0,74	7,4
Ca	0,81-1,75	1,30	13
Mg	0,32-0,66	0,50	5,0
Fe	0,09-0,55	0,21	2,1
Zn	0,005-0,012	0,009	0,09

De estos datos se puede calcular que la aplicación anual de 40 toneladas de abono por hectárea agrega 540kgN/ha y considerando que un cultivo de maíz con rendimiento de 4.600kg/ha removerá unos 180kgN/ha (aproximadamente 1/3 de la cantidad aplicada), el resto del N aportado por el abono puede ser lavado y ocasionar contaminaciones. Si se procediera racionalmente se necesitaría un área de suelo tres veces superior para dispersar este abono.

Este es un ejemplo de las discordias entre la protección del ambiente y la práctica de disponer de suelos para las grandes cantidades de residuos generados por la actividad del hombre.

Tratamiento de los residuos

Complejos sistemas microbiológicos que transforman estos residuos resultantes de la actividad humana y que pueden llegar a provocar graves problemas de contaminación, se desarrollaron a lo largo de miles de años, sobretodo en el suelo. Como en general, la tasa de degradación de residuos orgánicos es extremadamente inferior a su tasa de generación, y además, muchos de los residuos no son productos naturales, el hombre se ve obligado a su tratamiento en el campo, donde se producen, o en plantas con reactores, especialmente diseñados.

Los tratamientos a que son sometidos los residuos se pueden agrupar en:

- **físicos**: transformaciones termoquímicas, pirólisis (altas temperaturas)

- **químicos**: hidrólisis ácida o alcalina

- **biológicos y enzimáticos:** fermentaciones, enriquecimiento proteíco para forrajes, hidrólisis enzimática

El cuadro 3 resume estos procesos.

Los objetivos en el tratamiento de los residuos son varios:

- **disminuir la carga contaminante** (ejemplo: tratamientos de grandes volúmenes de estiércol en la industria lechera)

- **aprovechar los restos como fuente de energía** (producción de etanol, H_2, metano)

- **obtener moléculas de interés** (producción de proteínas celulares)

● **producir alimentos** (cultivo de hongos, proteínas microbianas, lombrices)

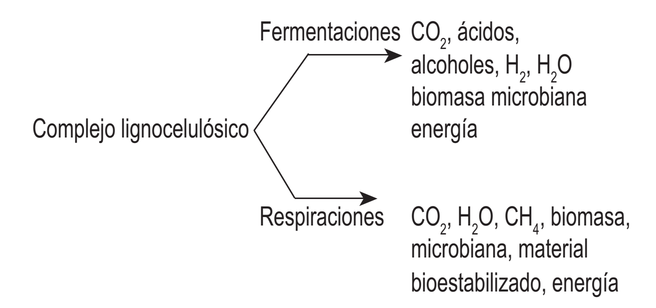
Cuadro 3- Procesos empleados en la biodegradación de residuos

Biológicos	No biológicos
Orgánicos biogás, proteínas unicelulares, etanol	**Orgánicos** incineración, fabricación de ladrillos
Inorgánicos lixiviación bacteriana, nitrificación-desnitrificación	**Inorgánicos** reciclaje de minerales

El tratamiento de un residuo puede conducir a más de un objetivo, por ejemplo, el compostaje de restos del tambo disminuye la carga contaminante y se logra un sólido estabilizado empleado como fertilizante. La biodegradación anaerobia además de disminuir la contaminación ambiental, produce energía (CH_4) y un residuo empleado como fertilizante.

Procesos biológicos

En los residuos orgánicos derivados de vegetales, el complejo lignocelulósico es el más lentamente degradable en procesos aerobios o anaerobios.



Comparación de procesos de biodegradación aerobia y anaerobia de residuos

A. Residuos orgánicos

● residuos de cosechas, como cáscara y pajas de cereales, aserrín, de alto contenido en lignocelulosa

En **aerobiosis** ocurren procesos de respiración:

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 6CO_2 + 6\ H_2O$ + biomasa microbiana $\Delta G° = -2828$ Kj/ mol/glucosa

100% 60% 40%

Como se aprecia, la alta eficiencia en la asimilación del C conduce a la producción de **gran volumen de biomasa microbiana.** Los residuos son removidos, pero el tratamiento de efluentes contaminados con materia orgánica requiere grandes superficies (lagunas) y queda un gran volumen de barros (**biomasa microbiana, residuos lignocelulósicos sólidos)**, que requieren nuevos tratamientos, en general, uno anaerobio.

En **anaerobiosis** ocurren fermentaciones y respiraciones anaerobias:

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 3\ CH_4 + 3CO_2$ + biomasa microbiana

l00% 45% 45% 10% $\Delta G° = -394$ Kj/mol glucosa

Los residuos son removidos en forma incompleta, queda amonio, SH_2, ácidos grasos, que hacen necesario un tratamiento aerobio posterior. Son, por el contrario, procesos de bajo costo que emplean pequeños reactores y originan pocos barros (residuos de biomasa y materiales lignocelulósicos no atacados).

B. Residuos inorgánicos

● **compuestos nitrogenados**

en aerobiosis $NH_4^+ + O_2 \longrightarrow NO_2^- \longrightarrow NO_3^-$

en anaerobiosis $NO_3^- + e^- + H^+ \longrightarrow N_2 + N_2O$

El ciclo de nitrificación y desnitrificación asegura la eliminación del N de los ecosistemas hacia la atmósfera, en forma de gases.

● **compuestos con azufre**

en aerobiosis $S°, S^= \longrightarrow SO_4^=$

en anaerobiosis $SO_4^= + e^- + H^+ \longrightarrow H_2S$

$+ Me \longrightarrow SMe$
(metales)

($SO_4^=$ reducción) $\longrightarrow$ (precipitado, por ejemplo como S Fe, negro)

- **compuestos con fósforo**

en aerobiosis Pi + poli-PO_4^{-3} ⟶ poli-PO_4^{-3}(n+1)

en anaerobiosis poli-PO_4^{-3} (n+1) ⟶ poli-PO_4^{-3} + Pi

- **metales pesados**

en anaerobiosis $SO_4^{=}$ + $8H^{+}$ ⟶ $S^{=}$ + Me^{++} ⟶ SMe que precipita

Biodegradación aerobia de residuos orgánicos

Restos con alto contenido de agua

Los residuos pueden contener alto nivel de agua, como por ejemplo los efluentes de la industria láctea, aguas servidas, etc. Su tratamiento se realiza en forma continua, en dispositivos tipo piletas, que dependen de la difusión natural del aire que se mezcla con las aguas a tratar por corrientes térmicas o producidas por el viento. En algunos casos se utilizan **aireadores** mecánicos, que incrementan la difusión del aire atmosférico en el agua y aseguran vigoroso crecimiento de las bacterias aerobias.

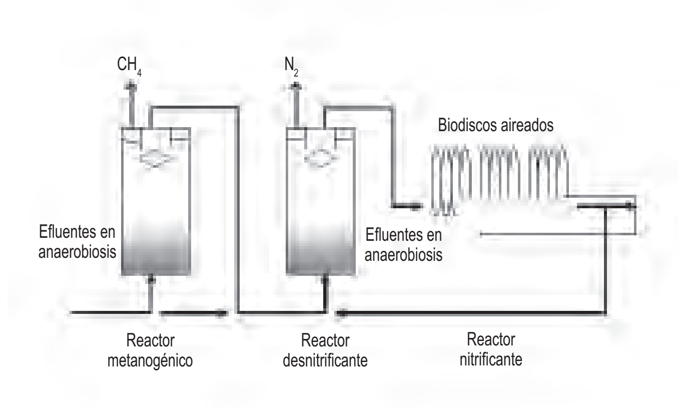


Figura 1- Esquema de usina de tratamiento de aguas residuales

Las aguas vertidas por industrias, establecimientos agropecuarios se tratan más aceleradamente en reactores. En la figura 1 se esquematiza un modelo donde primero el proceso es anaerobio, se pierde metano y N_2. Luego el proceso es aerobio y los compuestos reducidos de N y S se transforman en nitratos y sulfatos, que vuelven al tratamiento anaerobio donde ocurren respiraciones anaerobias que aseguran la pérdida de estos elementos a la atmósfera.

Restos sólidos

Compostaje

Compostaje es el término que se usa para designar la **degradación aeróbica y termófila** de materiales orgánicos de diferente origen, en estado sólido, realizado por comunidades microbianas quimioheterotróficas existentes en los propios residuos, bajo condiciones controladas del que se obtiene un producto estable, el *compost*, que puede ser utilizado como fertilizante. Debería traducirse el término *compost* por compuesto, pero lamentablemente se continúa con la denominación inglesa la que es usada también en otros idiomas.

Ventajas del compostaje

Si los residuos orgánicos son enterrados pueden impactar al ambiente. El agua que percola a través del residuo puede lixiviar sustancias hacia las aguas subterráneas. Se produce metano como consecuencia de la degradación de la materia orgánica en ausencia de aire, gas con importante efecto invernadero, 30 veces más perjudicial que el dióxido de carbono.

* El compostaje remueve una gran parte de los sustratos orgánicos biodegradables de los residuos y reduce el tiempo de biodegradación en relación a los procesos anaerobios, con liberación de menor cantidad de gases y menos pérdidas por lixiviado.

* Se disminuye el volumen, peso o tenor de humedad, en relación al material original, lo que facilita el almacenamiento, transporte y empleo del residuo

* El *compost* puede colaborar con el control de enfermedades de las plantas y reducir las pérdidas en las cosechas en agricultura y horticultura.

* El agregado de *compost* a los suelos evita la disminución de la materia orgánica, contribuyendo a la fijación del carbono en los mismos. La producción de *compost* y su incorporación al suelo superficial crea un reservo-

rio potencial de carbono. Su aplicación al suelo puede economizar la aplicación de nutrientes, vía los fertilizantes sintéticos.

* El *compost* puede reemplazar a la turba como medio de crecimiento para plantines en viveros forestales y hortícolas.

* También puede reducir la necesidad de encalado al ejercer efecto tampón contra las caídas del pH.

* Esta tecnología presenta costos competitivos con otras tecnologías de manejo de residuos (físicos, químicos).

* Se reduce la cantidad de restos producidos por la sociedad y satisface la necesidad de obtener rellenos para el suelo y macetas (viveros).

* Constituye una técnica para obtener la estabilización de la materia orgánica en forma rápida y en condiciones que no provocan inmovilización del nitrógeno en el suelo al ser aplicado. Al mineralizarse provee en forma lenta, los nutrientes que las plantas necesitan.

En la naturaleza esta estabilización se da en tiempo indeterminado, de acuerdo a las condiciones que encuentra el sustrato.

Otras ventajas son:

- reducción de costos en la remoción de nitratos del agua
- reducción de la susceptibilidad a la erosión del suelo
- reducción de los requerimientos de riego

Inconvenientes del compostaje

* En el compostaje ocurren emisiones (lixiviado, olores, aerosoles con microorganismos y polvo) y cuando se realiza en instalaciones centralizadas de gran escala, el proceso consume energía

* Algunos herbicidas, no son destruidos por el compostaje y pueden dañar los cultivos. Estos herbicidas son usados sobre malezas y pueden pasar a través del tracto digestivo de los animales, depositándose en las camas de paja y estiércol, que pueden ser luego compostados

* Contaminantes orgánicos persistentes (COP) se encuentran en menor concentración en el *compost* de bioresiduos y de residuos de poda en relación a los que se acumulan a partir de residuos sólidos urbanos (RSU)

* La presencia de plásticos en los residuos está desafiando los sistemas industriales del bioproceso ya que las partículas pequeñas pueden permanecer en el *compost* aún después de repetidos tamizados

Proceso de compostaje

Es un proceso microbiológico realizado en la naturaleza por organismos nativos: bacterias, hongos y actinomicetes, principalmente, actuando en sucesión de predominancia, según la influencia de factores, como la composición química del material original, su relación C/N, humedad, aireación, temperatura, pH.

Los primeros sustratos atacados son hidratos de carbono simples, proteínas, compuestos solubles en alcohol y otros solventes orgánicos (ceras, grasas, cutinas).

La fracción ligno-celulósica no es degradada en su totalidad y se mezcla con la biomasa microbiana en el producto final.

Involucra 3 etapas:

- pre-proceso
- biodegradación
- maduración

Pre-proceso puede incluir solamente la molienda y pulverización (residuos de parques y jardines) o puede requerir tratamientos más complejos para remover contaminantes. El tamizado separa partículas según su tamaño. Las máquinas separan papel, plásticos y otros constituyentes no deseados de la materia orgánica.

Biodegradación requiere aireación en pilas o en dispositivos adecuados con aireación forzada. Durante las primeras semanas, la temperatura de la pila aumenta drásticamente debido a la energía generada por los microorganismos.

La materia orgánica se descompone más eficiente y completamente en condiciones de oxígeno disponible y a temperaturas elevadas. Las proteínas liberan amoníaco y nitratos, mientras que las grasas y carbohidratos forman dióxido de carbono y agua, vía ácidos orgánicos. Se suceden fases:

- **fase mesófila**, en la que predominan bacterias y hongos productores de ácidos que atacan a la materia orgánica fácilmente degradable, generando calor que favorece el desarrollo de organismos termófilos

- **fase termófila:** a partir del 10º día, con la elevación de la temperatura, comienza esta etapa y la población dominante se compone de actinomicetes, bacterias y hongos termófilos o termotolerantes.

Los microorganismos que crecen a temperaturas medias (microorganismos mesófilos) son inhibidos con el aumento de la temperatura, mientras que predominan los microorganismos termófilos. Esta fase de alta temperatura es importante porque destruye semillas de malezas y patógenos de animales y plantas y acelera las reacciones de biodegradación.

Esta elevación de la temperatura y la consecuente alteración de la flora microbiana son influenciadas, en gran parte, por la disponibilidad de oxígeno.

Se produce además, la inactivación de **microorganismos patógenos** como coliformes, *Salmonella, Streptococcus, Aspergillus.* Las pilas de *compost* más intensamente removidas al comienzo alcanzan temperaturas más elevadas, hasta **75°C**, mientras que las menos aireadas sólo llegan hasta los **60°C**. Las bacterias formadoras de esporas sobrevivirán a estas temperaturas.

La pila se da vuelta o se airea forzadamente, para permitir bajar la temperatura y además reinocular el material con microorganismos desde la atmósfera ya que la alta temperatura produjo disminución de microorganismos mesófilos, por pasteurización del sustrato. La temperatura vuelve a ascender, reiniciándose el ciclo. Las pilas se dejan de remover y/o airear cuando la temperatura no se eleva más, lo que indica que los sustratos fácilmente degradables han sido mineralizados.

Esta etapa culmina al agotarse los nutrientes fácilmente empleados por los microorganismos, y el *compost* va perdiendo calor. La materia orgánica se ha estabilizado, acumulándose aquella de lenta degradación (fracción lignocelulósica).

Etapa de maduración: ocurre una lenta degradación de la materia orgánica hasta que el volumen se reduce aproximadamente 50%.

El material va retornando a una nueva **fase mesófila**, pero ahora con otra composición química, puesto que los nutrientes fácilmente atacables ya han sido consumidos por los microorganismos. Reaparecen, hongos y bacterias mesófilas provenientes del medio. A medida que el *compost* va tomando la temperatura ambiente pueden ser encontrados protozoarios, nemátodos, hormigas, miriápodos, lombrices e insectos diversos.

La maduración involucra mayor biodegradación de compuestos y toma varias semanas. En esta etapa se forman nitratos y las fitotoxinas son degradadas. Esta es una fase importante en el proceso y el *compost* inmaduro puede provocar serios daños a los vegetales.

La mayoría de los *compost* son vendidos como mejoradores de suelo. Pueden ser mezclados con otros materiales para rellenar macetas en viveros, usarse en coberturas en superficies deportivas y como coberturas de suelo para sitios remediados. También pueden ser usados para remediar tierras contaminadas, ayudar a prevenir la erosión del suelo y como cobertura diaria en los sitios de disposición final de residuos. La **biomasa microbiana** puede representar hasta el 25% del peso total del *compost.*

Microorganismos presentes

El cuadro 4 presenta algunas de las especies identificadas.

Los hongos y actinomicetes son activos degradadores de la celulosa y otros materiales más resistentes. Muchas bacterias atacan la celulosa, pero hacia el final del compostaje, cuando la temperatura disminuye, son hongos y actinomicetes los que predominan. Para asegurar

una buena actividad de estos organismos, es necesario mezclar los materiales en forma frecuente.

Cuadro 4 - Principales microorganismos aislados de un *compost*

Bacterias	Actinomicetes
Mesófilas	***Termotolerantes***
Cellulomonas folia	*Micromonospora vulgaris*
Chondrococcus exigus	*Nocardia brasiliensis*
Myxococcus fulvus	*Streptomyces rectus*
Thiobacillus thiooxidans	*S. thermofuscus*
Thiobacillus denitrificans	*S. thermophillus*
Aerobacter sp.	*S. thermoviolaceus*
Proteus sp.	*Thermonospora fusca*
Pseudomonas sp.	*T. glaucus*
	Thermoactinomyces sp.
	Thermopolyspora sp.
Termófilas	
Bacillus stearotermophilis	
Hongos	
Mesófilos	***Termófilos***
Fusarium culmorum	*Aspergillus fumigatus*
F. roseum	*Humicola insolens*
Stysanus stemonitis	*Mucor pusillus*
Coprinus cinereus	*Dactylomyces crustaceous*
Aspergillus niger	*Torula thermophila*
Geothricum candidum	
Mucor jansseni	

Son enzimas hidrolíticas extracelulares las que actúan en la primera etapa, liberando moléculas menores, solubles en agua. La actividad de varias enzimas ha sido monitoreada en el proceso. La actividad celulasa desminuye la cantidad de celulosa en un 25% en unas tres semanas. Las actividades de lipasas, proteasas y amilasas crecen y luego descienden en las sucesivas etapas del compostaje (decrecen marcadamente en la fase termófila). La desnaturalización de enzimas se correlaciona con la muerte del microorganismo por el calor. La recuperación del número de microorganismos y la actividad enzimática en el interior de la pila luego de la fase termófila se atribuyen a la reintrodución de organismos que sobrevivieron en las zonas externas, más frías de la pila o a partir de contaminación por el aire.

Inoculación

Se ha intentado seleccionar microorganismos para usarlos como inoculante en cultivos puros o mezclas. Existen a nivel comercial productos recomendados para la inoculación de diferentes tipos de residuos. Sin embargo, los datos encontrados en la bibliografía señalan escasas diferencias en el producto final entre restos inoculados y sin inocular.

Los microorganismos autóctonos, existentes en esos materiales se encuentran en general en cantidad y calidad suficiente para producir la descomposición. La aireación de las pilas asegura la multiplicación de los microorganismos en toda la masa.

Para que los sustratos puedan ser **inoculados** con éxito, sería necesario en primer lugar esterilizarlos o pasteurizarlos para luego inocularlos. La cantidad de inóculo puede representar una limitante, teniendo en cuenta los grandes volúmenes que normalmente se procesan.

Residuos vegetales secos, como los restos de cosechas (pajas de alta relación C/N) pobres en microorganismos pueden ser compostados mezclándolos con estiércol de animales, lodos o cualquier material que posea alta carga microbiana.

Tecnología

El compostaje puede realizarse en:

- **en el campo, en pilas**, al aire libre, sobre piso de tierra o pavimentado, con o sin aireación forzada

- **en silos, en digestores o usinas altamente tecnificadas**, para el tratamiento de grandes volúmenes de sólidos, como por ejemplo los residuos domiciliarios. Se usan **reactores** cerrados con control de aireación, humedad, temperatura y tiempo de retención. En estos últimos, el proceso puede completarse entre 5-7 días, mientras que en las pilas, puede llevar 3 a 8 semanas, o más para lograr un *compost* adecuado

La experiencia ha demostrado que las dimensiones ideales para las pilas de desechos son las siguientes:

largo: 2,5 a 3,5 m
altura: 1,5 a 1,8 m, que baja al final de 1/3 a 1/6
ancho: variable, nunca menor de 2 m

El peso disminuye de 50 a 80%, y el volumen total se reduce entre un 20 y un 60%. La pila nunca puede ser muy alta, porque se corre el riesgo de que las capas superiores ejerzan presión sobre las inferiores, compactándolas, provocando anaerobiosis y los consiguientes procesos de fermentación y putrefacción.

En cuanto a la forma, las pilas pueden tener sección triangular o trapezoidal: la triangular es recomendada para estaciones lluviosas, pues favorece el escurrimiento del agua, la trapezoidal, por el contrario, facilita la infiltración del agua.

Materiales a compostar

En el cuadro 5 se observa la composición de distintos materiales a compostar y su contenido en nitrógeno y el cuadro 6 resumen los principales factores que afectan al proceso de compostaje.

Cuadro 5 - Composición de residuos a compostar

Materiales	%N sobre peso seco	Relación C/N
Orina de animales	15-18	0.8
Sangre seca	10-14	3
Harina de cuernos	12	ND
Harina de pescado	4-10	4-5
Torta de oleaginosa	3-9	3-15
Lodos cloacales	5.5-6.5	6-10
Fangos activados	5-6	6
Harina de huesos	2-4	8
Cama de aves	4	ND
Pasturas jóvenes	2-4	12
Desechos de cervecería	3-5	15
Estiércol de cerdo	1.9	ND
Estiércol vacuno	1.0-1.8	ND
Paja de trigo	0.6	80
Hojas recién caídas	0.4-0.1	40-80
Restos de remolacha	0.3	150
Aserrín fresco	0.1	500
Papel	0	infinito

ND: No determinado.

Cuadro 6- Factores que afectan el compostaje

*** Relación C/N**
>30/1 = proceso lento
25-35/1 = óptimo
< 25/1 = pérdidas de nitrógeno

*** Aireación**
necesaria para la degradación

*** Humedad**
>60% = ausencia de aire: putrefacción
40-60% = óptima
< 40% = reducción de actividad microbiana
< 12% = cesa la actividad microbiana

Otros: temperatura, granulometría

Principales factores que afectan el compostaje

Relación C/N: cuando la materia prima presenta alta relación C/N, se corrige agregando materiales ricos en N (estiércol, camas de animales, tortas vegetales, residuos de matadero, fertilizantes orgánicos nitrogenados, etc.). Una relación ideal para un compostaje rápido se sitúa entre **25 y 35/1.**

Un *compost* con materiales de C/N inferior a 30/1conducen a pérdidas de N como amonio, agravadas si el pH es alcalino. En este caso, se agregan materiales ricos en C, como pajas, para elevar la relación C/N o tierra, arcillas o fertilizantes minerales que pueden retener el amonio.

Al final del compostaje la mayor parte del N está en forma de NO_3^- en solución que puede ser removido por el agua y aprovechado por las plantas. También puede ocurrir fijación de N_2 atmosférico por microorganismos especializados, en *compost* estabilizados, sin presencia de N amoniacal.

Granulometría: ésta se adecúa moliendo los materiales gruesos o agregando restos como pajas en residuos de granulometría fina como los lodos residuales u otros sustratos con tendencia a compactarse. También se pueden agregar materiales no degradables, como esferas porosas de arcillas, plástico, goma.

pH : el óptimo se sitúa entre 6,0 y 7,5, los vegetales presentan en general reacción ácida que se puede corregir agregando cal, ceniza vegetal u otro producto alcalino, evitando que el pH pase de 8,0.

Humedad: la humedad óptima para máxima eficiencia del proceso está comprendida entre 60 a 65% en peso para granulometrías groseras (pajas de cereales) y de 55 a 60% para granulometrías finas (aserrín, contenido ruminal). La humedad mínima debe ser de 40%; con humedad inferior al 12% la actividad biológica cesa y muy altas inducen anaerobiosis y pérdidas de nutrientes.

Se controla dentro de los límites recomendados por:

- **irrigación** al montar la pila, si la humedad de los residuos es baja

- **remover la pila** para provocar evaporación si la humedad es alta

La humedad se debe mantener en el entorno del 50% durante la fase inicial y del 30% en la fase final de estabilización.

Aireación: es importante para que la descomposición sea aerobia, más rápida y eficiente que la anaerobia. Su control es una de las tareas más difíciles y costosas. La concentración de O_2 no debe ser inferior al 5 y 10% del volúmen de los macroporos.

En los digestores cerrados la aireación se hace mecánicamente. En las pilas se produce en el mezclado o por sistemas de aireación forzada.

Temperatura: el calor es la primera información de que el proceso de descomposición se inició. La ausencia de calor en los primeros días indica un problema en: baja actividad microbiana, falta de O_2 por exceso de agua o material de granulometría muy fina. Las altas temperaturas son consideradas deseables por el hecho de destruir semillas de malezas y organismos patógenos, la mayoría sensibles al calor.

Se produce una **pasteurización** del material. Las altas temperaturas no deben extenderse mucho porque limitan a la microflora mesófila, coagulan proteínas y provocan pérdidas de N como amonio. La figura 2 presenta la variación más frecuente de temperatura durante las distintas fases del compostaje.

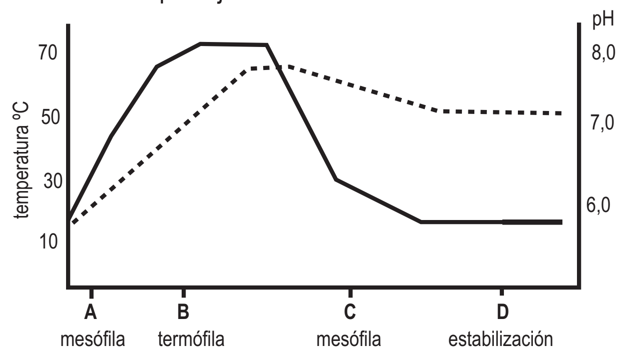


Figura 2- Cambios en la temperatura y el pH durante el compostaje

Calidad, análisis, estándares y mercados

La **aceptación** del producto final en el **mercado** depende de varios elementos que incluyen: el precio, la calidad y consistencia del producto, además de las garantías de que el producto no contiene niveles no aceptables de metales pesados, vidrio, plantas y patógenos.

La **calidad** del *compost* se refiere a las características físicas, químicas y biológicas, las que condicionan el impacto del producto sobre el ambiente y es resultante de la calidad de los materiales iniciales y de la calidad del proceso de compostaje.

Los **estándares** tienen en cuenta contaminantes, como metales pesados y desde el punto de vista microbiano, la ausencia de microorganismos patógenos. No existen estándares reconocidos mundialmente para productos derivados de bioresiduos; los estados miembros de la Unión Europea y Estados Unidos de América aplican sus propios estándares. El Uruguay, como en muchos países, se encuentra con la necesidad de establecer normas de calidad para estos biofertilizantes producidos en el país o importados. La madurez de los productos se establece frecuentemente por el consumo de O_2 o la liberación de CO_2 durante su incubación. Cuanto más

maduro está el *compost* menos O_2 es consumido. Otro *test* es la liberación endógena de calor: *compost* inmaduro calienta a 65-70ºC en dos o tres días, uno maduro no eleva la temperatura a más de 30ºC. No debe contener fitotoxinas u otros inhibidores de la germinación de semillas, ni metales pesados.

Se han descrito varias técnicas para evaluar la calidad de un *compost:* evaluación de actividades respiratorias y enzimáticas del suelo con y sin aditivos, su relación C/N, la presencia de sustancias fitotóxicas, de metales pesados, se analizan también el nivel de sustancias del tipo humus. (Anexo práctico) y el contenido de nutrientes (cuadro 7)(Zibilske, 1998). Muchos *compost* son buenas fuentes de nutientes para los cultivos, con cantidades apropiadas de N, P, S, etc.

Estos productos difieren de los fertilizantes inorgánicos en que los *compost* requieren degradación microbiana para liberar la mayoría de sus nutrientes y ponerlos a disposición de los vegetales. En los análisis de calidad se incluye entonces su facilidad de mineralización. Es necesario esta determinación a los efectos de determinar las dosis a aplicar. Muchas veces estos productos se acompañan con fertilizantes químicos a los efectos de brindar nutrientes a los vegetales desde su aplicación.

En promedio, un 10% del *compost* se mineraliza en el primer año de aplicación, luego esta tasa cae a 1 a 3%, asemejándose a la degradación de la materia orgánica nativa. Como el humus, los *compost* aumentan la agregación del suelo, la aireación, infiltración de agua, capacidad de retención del agua y la capacidad de intercambio catiónica.

La **estabilidad** del *compost* es una característica importante desde el punto de vista del mercado. La descomposición activa y continua del *compost* cuando se agrega al suelo puede inhibir el crecimiento de las plantas por la reducción del oxígeno y del nitrógeno disponibles en la zona de las raíces o por la presencia de compuestos fitotóxicos.

En resumen: el compostaje de residuos biodegradables es un excelente camino para reducir la cantidad de residuos a ser incinerados o volcados a causes de agua, o enterrados y la cantidad de metano liberado a la atmósfera. Es un proceso esencialmente microbiano que puede ser controlado por los factores que afectan a los microorganismos intervinientes. La falta de sustratos adecuados, niveles de humedad o temperatura fuera de los rangos óptimos y problemas con la difusión del oxígeno al interior de la pila, son los factores limitantes más frecuentes en el compostaje.

Se necesitan normas claras para dirigir la recolección y el tratamiento de estos residuos, además de buenos controles de calidad y estándares obligatorios a los efectos de recomendar productos de buena calidad e inocuos para el hombre y la naturaleza.

Cuadro 7- Propiedades de algunos *compost*

	pH	humedad%	densidad (kg/m^3)	N%	P%	K%
Desechos municipales líquidos	6-6,5	20-35	772	2,21	0,97	0,27
Estiércol	5,8-7,2	34-61	304-400	0,7	0-0,03	0,02-0,36
Residuos alimenticios	-	40	352	0,95	0,13-0,46	0,48-0,89
Sólidos municipales	-	45	352-481	-	-	-

Vermicompostaje

Constituye una variación en la tecnología del compostaje en la cual se utilizan **lombrices** para acelerar la degradación de la materia orgánica. La lombriz trabaja cavando galerías en el suelo o en el *compost*, moliendo y humedeciendo partículas en el tubo digestivo (acción más mecánica que biológica).

Sus excrementos están formados por agregados de tierra, materia orgánica digerida y secreciones intestinales y urinarias, de más fácil asimilación por las raíces que reciben el nombre de **coprolitos**. Estos son más neutros que los suelos, pobres en arcillas y ricos en materia orgánica, nitratos, P, K, Ca y Mg, presentando alta **CIC** (capacidad de intercambio catiónico), saturación en bases y alto porcentaje de humedad. El cuadro 8 resume las características del proceso y la figura 3 muestra un cantero de vermicompostaje.

Cuadro 8- Vermicompostaje

- ➢ el material se dispone en canteros
  * ancho: 1-1.20 m
  * altura: 0.30-0.40 m
  * largo: variable
- ➢ material picado y bien mezclado (puede ser precompostado)
  * sustrato recomendado: estiércol, restos de café, té y yerba
  * evitar: ajo, cebolla, residuos cítricos
- ➢ humedad: 60-80%

Para la elaboración del vermicompostaje pueden utilizarse una gran variedad de sustratos, las lombrices prefieren los estiércoles pero atacan cualquier tipo de materia orgánica, siempre que no sea muy ácida o muy olorosa. El vermicompostaje es una técnica competitiva frente a compostaje tradicional aunque presenta algunas **desventajas**:

- necesita más mano de obra
- el material debe estar triturado para una mayor eficiencia en la degradación
- necesita de una mayor área: 1000 m^2 para producir 100 ton de *compost* por día
- no presenta fase termófila, que mataría a la fauna

La descomposición de la materia orgánica es realizada por los **microorganismos** del tracto digestivo de las lombrices.



Figura 3- Producción de *vermicompost*

En resumen: el empleo de *compost* o *vermicompost* en la agricultura es muy ventajoso, funcionan como fertilizantes nitrogenados de liberación lenta con acción residual prolongada, de modo que se incrementa la eficiencia de absorción por las plantas, con mayores productividades al compararla con el empleo de fertilizantes nitrogenados solubles. Su aplicación puede incrementar la retención de agua en el suelo. Prácticamente todos los restos orgánicos generados y acumulados en establecimientos agropecuarios son capaces de estabilizarse mediante este proceso microbiano.

El cuadro 9 presenta los resultados del agregado de 20 toneladas de *compost* por hectárea sobre el rendimiento de maíz, en un suelo arcilloso calcáreo, con cultivo anterior de trigo y con riego.

Cuadro 9 - Efecto del agregado de *compost* en cultivo de maíz

	Con *compost*	Sin *compost*			
Rendimiento kg/ha	7.750a	5.850b			
Interacción del *compost* x dosis de N-urea (kg/ha)					
Dosis de N	0	50	100	150	200
Con *compost*	7750	9940	10470	10830	10880
Sin *compost*	5850	8750	9640	10740	10470

Como se aprecia globalmente sobre todas las parcelas, el efecto de la enmienda fue favorable (a 10% de confianza), sobretodo sin fertilización o con bajas dosis de nitrógeno. El agregado de *compost* economiza unos 50kg de N-urea/ha, como surge de los datos del cuadro 9.

El cuadro 10 compara estos procesos controlados con la degradación de la materia orgánica realizada en la naturaleza en condiciones naturales.

Cuadro 10- Diferencias entre degradación de la materia orgánica en el suelo y en el compostaje

- La concentración de nutrientes es mayor en el *compost*
- La estructura del suelo no permite la liberación brusca de calor (el mismo se disipa y la temperatura no sube)
- Los organismos termófilos no se incrementan en el suelo como lo hacen en los *compost*
- La velocidad de los cambios es muy diferente (45-200 días en el *compost*, años en el suelo)
- La acción del viento y el mezclado facilita la degradación en el *compost*
- Mayor diversidad de materiales compostados
- Baja carga contaminante y remoción de semillas de malezas en el *compost*

Biodegradación anaerobia de restos orgánicos

La digestión anaerobia consiste en una serie de procesos de degradación microbiana de la materia orgánica en ausencia de agentes oxidantes (O_2, NO_3^-, $SO_4^=$).

Como productos finales de esta degradación se produce una mezcla de gases (**biogás**) con predominio de metano (CH_4) usado como combustible y materia orgánica estabilizada, el **biofertilizante**, activador de la población microbiana y mejorador de las propiedades físicas del suelo.

Interviene en este proceso una población microbiana muy heterogénea que actúa en una cadena alimentaria. Uno de los grupos terminales de esta cadena son las **metanobacterias**, responsables de la producción de gas **metano**, usado como combustible. El sustrato que entra a los biodigestores rurales está compuesto principalmente por estiércol u otras materias orgánicas diluídas: una mezcla compleja de celulosa, hemicelulosa, lignina, proteínas, lípidos, minerales, etc. Los microorganismos utilizan estos compuestos para obtener energía y como fuente de carbono, mineralizando cada vez más los restos orgánicos hasta alcanzar un equilibrio. En la digestión anaerobia se distinguen cuatro etapas (figura 4).

- Hidrólisis de biopolímeros
- Fermentación
- Acetogénesis y deshidrogenación
- Metanogénesis

Hidrólisis: la primera etapa de la degradación de la materia orgánica es llevada a cabo por enzimas hidrolíticas de múltiples microorganismos que utilizan los compuestos de la hidrólisis. Posteriormente actúa otro grupo que ataca los productos resultantes de la acción del primer grupo y asi sucesivamente conformando una cadena trófica con una población microbiana en equilibrio.

La **fermentación** es la fuente de energía en las condiciones de anaerobiosis y de falta de luz de este sistema. Los

principales productos finales de la hidrólisis y la fermentación son CO_2, H_2, propionato, acetato y butirato.

Existen bacterias que degradan el propionato y el butirato llevándolo a acetato, H_2 y CO_2. Estas bacterias actúan sinérgicamente (**sintrofia**) con otros microorganismos que consumen el H_2 producido y de esta forma permiten que se establezca el primer grupo (que es inhibido por el hidrógeno).

La **metanogénesis** (respiración anaerobia) es la última etapa de la cadena trófica y las bacterias metanogénicas producen CH_4 por la siguiente reacción:

$$CO_2 + 4\,H_2 \longrightarrow CH_4 + 2\,H_2O$$

Como se observa consumen hidrógeno, por lo que poseen un papel regulador en el biodigestor.

También se puede producir metano a partir de acetato (metanogénesis acetoclástica).

$$CH_3\,COOH \longrightarrow CH_4 + CO_2$$

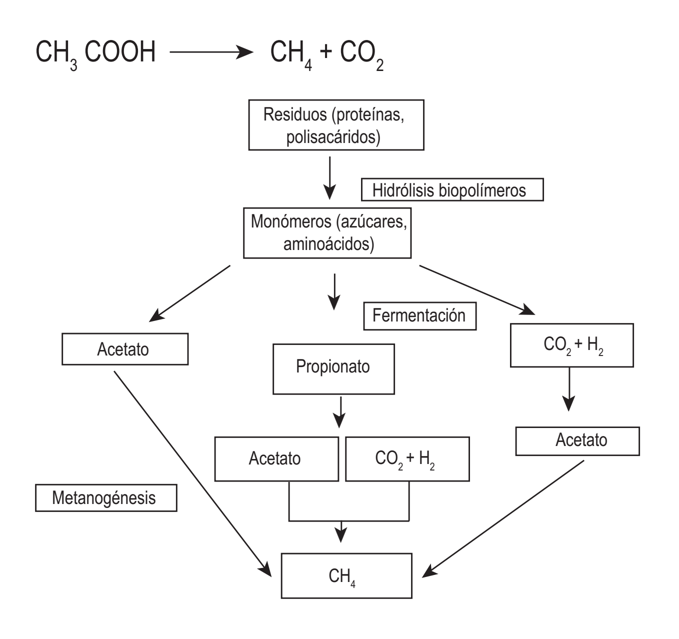


Figura 4- Esquema de las etapas de la digestión anaerobia

Población microbiana

Dentro del biodigestor coexisten distintos grupos de microorganismos: bacterias, hongos y protozoarios (Soubes, 1994). Cada biodigestor es diferente ya que debido a que las interacciones entre los microorganismos son múltiples y complejas, en cada uno se alcanzarán poblaciones distintas.

No se puede hacer consideraciones taxonómicas generales pero es importante conocer los grandes grupos fisiológicos de microorganismos presentes. Los microorganismos se agrupan de acuerdo a las reacciones que emplean en la generación de energía y se relacionan a su vez con el consumo y producción de hidrógeno.

La clasificación se esquematiza en el cuadro 11.

Cuadro 11 - Microorganismos en biodigestores anaerobios

Grupo	Características
Productores de hidrógeno	
hidrólisis de biopolímeros, fermentación de azucares, aminoácidos, ácidos grasos (bacterias, hongos, protozoos)	
● anaerobias facultativas	consumen el O_2 presente
● anaerobias estrictas	actúan a bajo nivel de O_2, fermentativos
● aerotolerantes	actúan en presencia de O_2, bacterias lácticas
Bacterias sintróficas: acetogénesis y deshidrogenación	
● anaerobias obligadas: requieren siempre de otro microorganismo para crecer	
● anaerobias facultativas: pueden crecer en cultivo puro	
Consumidores de hidrógeno	
Bacterias metanogénicas, anaerobias estrictas, productoras de CH_4, crecen sólo con menos de 5 ppm de O_2	

Bacterias hidrolíticas y fermentadoras

Se encuentran bacterias anaerobias facultativas como las enterobacterias, las aerotolerantes como las del ácido lácti-

co y bacterias anaerobias estrictas como *Clostridium, Bacteroides, Propionibacterium.* Las enterobacterias como *E. coli* poseen la enzima **formiato liasa** responsable de la generación de H_2 a partir de formiato, pero tal vez su rol fundamental es la remoción del O_2. Las bacterias lácticas producen ácido láctico y a veces etanol y CO_2, a partir de azúcares. *Propionibacterium* fermenta ácido láctico con liberación de H_2 y acetato, o acetato y propionato.

Bacterias acetogénicas reductoras obligadas de protones

Son las conocidas bacterias sintróficas obligadas que se caracterizan por su imposibilidad de crecer en cultivo puro. Necesitan asociarse estrechamente a microorganismos consumidores de H_2. En el laboratorio se las mantiene junto a una bacteria metanogénica hidrogenofílica, o a una sulfatoreductora en presencia de sulfato, que en estas condiciones funciona como consumidor de H_2. Los sustratos naturales que oxidan son ácidos grasos saturados, etanol y benzoato. Algunas de las reacciones de las que generan energía:

$$\text{etanol} + H_2O = \text{acetato}^- + 2H_2 + H^+$$

$$\text{butirato}^- + 2H_2O = 2\text{acetato}^- + 2H_2 + H^+$$

No pueden transferir los equivalentes de reducción del NADH a ningún aceptor externo que no sean los protones. Algunas especies conocidas: *Syntrophobacter wolinii* que usa propionato y crece en cocultivo con *Desulfovibrio, Syntrophomonas sapovorans,* crece con ácidos grasos de C_4 a C_{18} asociada con *Methanospirillum*.

Bacterias sulfatoreductoras

Emplean los productos de las fermentaciones como sustratos en la reducción de sulfatos a sulfuros, de la cual obtienen energía. Se dividen en dos grupos:

- **oxidantes completos** que liberan CO_2, H_2O y $S^=$, pueden degradar ácidos orgánicos de hasta 18 carbonos
- **oxidantes incompletos**: liberan acetato, CO_2, $S^=$, algunas propionato y butirato, que en general no pueden seguir degradando

La reducción del sulfato a sulfuro es más favorable termodinámicamente que la producción de metano. Si existe alta disponibilidad de sulfatos proliferarán estas bacterias con consecuencias negativas: van a emplear el H_2 (sustrato de las metanogénicas) y producen sulfuros, tóxicos a concentraciones elevadas e indeseable en el gas de salida.

En virtud del elevado número de bacterias sulfatoreductoras que existen en los reactores anaerobios y en los biodigestores rurales, aun en asusencia de sulfato (pueden metabolizar lactato dando acetato, CO_2 y H_2), se postula que ejercen importante rol como acetogénicas deshidrogenantes.

Bacterias acetogénicas

Son las que crecen a expensas de la reacción:

$$H_2 + 2CO_2 = \text{acetato} + H_2O + H^+$$

Pertenecen a géneros diversos como *Acetobacterium, Acetogenium y Clostridium.* También pueden realzar otros metabolismos y sólo un 10% del carbono en los reactores sufrirá esta transformación.

Bacterias desnitrificantes

Estas bacterias que obtienen energía de la oxidación de compuestos orgánicos y compuestos de azufre reducido e H_2, con nitratos como aceptores de electrones, están presentes en los reactores anaerobios y se les atribuye junto a las Enterobacterias el rol de remoción del oxígeno del sistema. Especies del género *Pseudomonas* son las más distribuídas en la naturaleza.

Bacterias metanogenéticas

Estos microorganismos tienen características especiales:

- son **Arquebacterias**, hoy denominadas ***archae***, organismos muy primitivos que se distinguen de las bacterias típicas por poseer un seudopeptidoglicano en su pared, algunos géneros poseen recubrimientos exteriores solamente proteícos (capa S en *Methanococcus*), o una capa polisacárida junto a la capa S

(*Methanosarcina)*, una capa S y seudomureína (*Methanothermus)* y diferente composición lipídica en la membrana lo que las hace muy resistentes a pH bajos, altas temperaturas.

- **son anaerobias estrictas** y requieren concentraciones de oxígeno menores de 5 mg/L en el cultivo

- **el pH óptimo** de la mayoría de las cepas aisladas es de 7

- **temperatura:** existen cepas mesófilas y termófilas

- **son los únicos microorganismos capaces de generar metano** y poseen enzimas exclusivas como **hidrogenasas** con cofactores como el F_{420} y F_{430}, que fluorece con luz ultravioleta de 420 nanometros y permite asi visualizar células y colonias de estos organismos. Estas metaloproteínas determinan mecesidades especiales de Ni, Fe, Co y Se. No presentan metabolismos alternativos.

- **Por los sustratos que pueden degradar se dividen en**:

1. **hidrogenotróficas**, capaces de producir metano a partir de H_2 y CO_2:

$$\mathbf{CO_2 + 4H_2} \longrightarrow CH_4 + 2H_2O$$

2. **aceticlásticos,** que producen metano y anhídrido carbónico a partir de acetato

$$\textbf{ácido acético} \longrightarrow CH_4 + CO_2$$

3. **metilótrofos,** que metabolizan compuestos como metilaminas y metilsulfuros

$$\textbf{metilamina} \longrightarrow 0{,}5\ H_2O + 0{,}75\ CH_4 + 0{,}25\ CO_2$$

$$\textbf{dimetilamina} + \mathbf{H_2O} \longrightarrow 1{,}5\ CH_4 + 0{,}5\ CO_2 + NH_3$$

$$\textbf{trimetilamina} + \mathbf{1{,}5\ H_2O} \rightarrow 2{,}25\ CH_4 + 0{,}75\ CO_2 + NH_3$$

El mayor número de especies de bacterias metanogénicas pertenecen al primer grupo, y las más frecuente son *Methanobacterium, Methanospirillum y Methanobrevibacter.* Muchas de ellas a su vez pueden emplear también formiato, algunas pocas isopropanol e isobutirato.

$$\textbf{ácido fórmico} \longrightarrow 0{,}25\ CH_4 + 0{,}75\ CO_2 + 0{,}5\ H2O$$

$$\textbf{metanol} \longrightarrow 0{,}75\ CH_4 + 0{,}25\ CO_2 + 0{,}5\ H_2O$$

El género *Methanosarcina* es el más versátil entre los metanogénicos, ya que posee especies capaces de emplear H_2, metilaminas y acetato. Los microorganismos metanogénicos son sensibles a **sustancias tóxicas** como sales de metales pesados, detergentes, desinfectantes y antibióticos, por lo que se debe prestar atención especial a este aspecto en el momento de cargar el biodigestor. Asimismo el amoníaco y el sulfuro resultan tóxicos a niveles superiores de 100 y 150 mg por litro, respectivamente.

La bioquímica y microbiología dentro del biodigestor deben ser tenidas en cuenta para el manejo del mismo. Por ejemplo, si aumenta la concentración de hidrógeno en el sistema, se detiene el metabolismo de las bacterias productoras de hidrógeno que también metabolizan butirato, propionato y ácidos grasos de cadena larga. En estas condiciones el biodigestor se acidifica y disminuye la producción de biogás, por lo que se debe interrumpir el ingreso de nuevo sustrato orgánico para restablecer el equilibrio original.

Biofertilizante

El efluente de la digestión anaerobia en los biodigestores se denomina biofertilizante. Es un producto muy apto para ser usado como fertilizante orgánico e inclusive muchos establecimientos agropecuarios instalan biodigestores con el fin primario de obtener un fertilizante orgánico complejo, cuya composición variará de acuerdo al material orgánico.

En los casos comunes de biodigestores rurales se utiliza **estiércol diluído,** el biofertilizante resultante es una suspensión homogénea cuyo valor no está dado en la cantidad de nutrientes químicos para las plantas (por ejemplo nitrógeno o fósforo), sino como **activador de la población microbiana** del suelo con la resultante dinamización de toda la actividad biológica.

En el proceso de digestión anaerobia la relación carbono/nitrógeno (C/N) baja, señalando una estabilización del producto, que se asemeja al humus, con la fracción lignocelulósica no degradada y abundante biomasa microbiana.

Muchas veces se aprecia un incremento en el porcentaje de nutrientes presentes en el biofertilizante respecto al material original. Sin embargo, el efecto principal sobre los cultivos no es a partir de los nutrientes químicos sino al **proceso activador** sobre la población microbiana del suelo. Asimismo, se mejoran las **propiedades físicas** del suelo (que son las que regulan la aireación y la dinámica del agua).

La aplicación de estos biofertilizantes en los primeros centímetros del suelo puede aportar en promedio:

$N\text{-}NH4^+$	252-280kg/ha sujeto a rápida mineralización
N-orgánico	336kg/ha liberado lentamente en la degradación
P total	200-336kg/ha (80% en la fracción orgánica)
K total	45-90kg/ha

Los valores varían de acuerdo a la fuente, al tratamiento y otros factores, pero se aprecia que la cantidad de nitrógeno aplicada en este ejemplo excede a los requerimientos vegetales, la misma tendencia se aprecia con los minerales, lo que refuerza la idea de aplicar controles en las dosis y en el manejo del suelo cuando se aplican estos biofertilizantes.

Biodigestores rurales

La figura 5 muestra los dos tipos más frecuentes de biodigestores empleados en establecimientos agropecuarios, el hindú y el chino. En el **modelo hindú**, el biogás formado se va acumulando bajo la campana que se eleva (flota) a medida que avanza el proceso. El biodigestor se carga por una caja de entrada y se descarga por una caja de salida. Todo el sistema se maneja con el principio de vasos comunicantes o sea que el volumen que entra por la caja de carga sale por la caja de descarga y el biodigestor mantiene siempre el mismo nivel. La presencia de una pared divisoria central hace un efecto de reciclaje dentro del biodigestor.

El biogás es transportado por cañerías hasta el lugar donde se emplea (calefacción del tambo, luz) e incluso se envasa en cilindros para usos familiares o como combustible para vehículos.

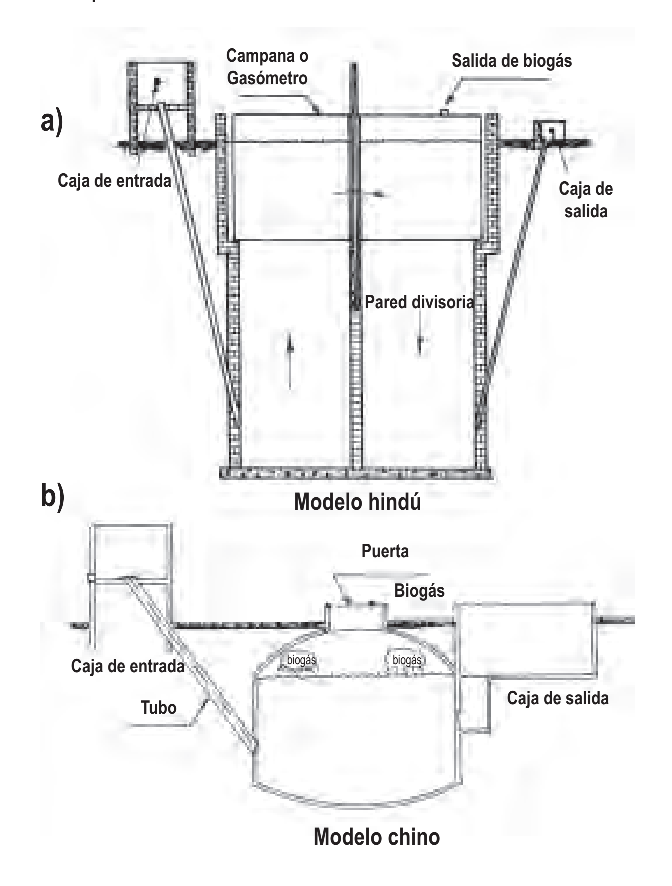


Figura 5 - Modelos de biodigestores
a) hindú, b) chino

El **modelo chino** requiere un diseño más preciso y posee gran resistencia estructural y su vida útil puede sobrepasar los 20 años. Consta de caja de carga del material (estiércol y agua), una estructura prIncipal cerrada y una cámara compensatoria de presión que es a la vez la caja de salida del material degradado. El gas se acumula en la bóveda con lo que aumenta la presión interna que hace que el contenido se desplace a la cámara compensatoria

de presión con lo cual sube el nivel de la misma. Al usarse el biogás la presión de la cámara baja y el líquido entra nuevamente al cuerpo principal.

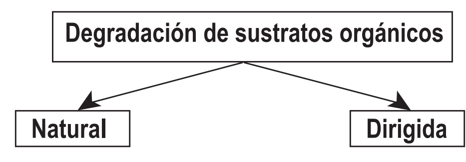
Según las condiciones climáticas se calculan unos 20 días para que ocurran las diferentes etapas del proceso

En el manejo de grandes volúmenes de **residuos domiciliarios e industriales** se emplean reactores anaerobios de distinto diseño que permiten que las 4 etapas del proceso se realicen rápidamente durante el flujo de líquido con restos orgánicos (3-5 días). También ocurre el proceso en lagunas donde los efuentes permanecen en períodos entre 5 a 30 días.

En resumen: los factores que más influyen en la elección de un sistema anaerobio son:

- la baja producción de lodo biológico (**biomasa**) con menores costos de deposición
- altas eficiencias de tratamiento (comparable a otras alternativas)
- bajos costos de inversión inicial y menores costos de operación (no requieren O_2)
- producción de metano (uso potencial como combustible)
- bajos requerimientos de nutrientes (menor que en el sistema aerobio)

La figura 6 resume las similitudes y diferencias entre la degradación natural, en el suelo mismo de restos orgánicos y la dirigida por el hombre desde muy antiguo, para conducir y acelerar los procesos degradativos.



- Los procesos de degradación de los residuos orgánicos tienen una dinámica continua: se trata de procesos que no se detienen
- Está sujeta a las condiciones ambientales

- Bajo condiciones controladas, se logra acelerar la velocidad de descomposición de residuos

Figura 6- Procesos de biodegradación natural y dirigidos

Bibliografía

Food and Agriculture Organization **Recliclaje de Materia Orgánica y Biogás, FAO,** 1986, Santiago de Chile

Kiehl, E. J. **Fertilizantes Orgánicos,** 1985 Editora Agronómica, Ceres, San Pablo

Lambais; M. R. Poluçao Organica e seu Controle. En : **Microbiologia do Solo,** 1992, Sociedade Brrasileira de Ciencia do Solo, Campinas (SP): 91-104

Mustin, M. **Le compost: Gestion de la matière organique,** 1987, François Dubusc (ed), París: 954 pp.

Soubes, M. Microbiología de la digestión anaerobia. En: **Tratamiento Anaerobio,** 1994 III Taller y Seminario Latinamericano: «Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales», Universidad de la República, Montevideo: 15-28

Stevenson, F. J. y Cole, M. A. **Cycles of Soils, Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients,** 1999 Wiley & Sons, New York

Zibilske, L. M. Composting of organic wastes. En: **Principles and Applications of Soil Microbiology**. 1998, Sylvia, Fuhrmann, Hartel y Zuberer (eds), Prentice Hall, N. Jersey: 482-497

Preguntas de repaso

1) Analice el concepto de residuo. Y cite ejemplos generados en establecimientos agropecuarios, en las ciudades y en los domicilios.
2) Compare los procesos de biodegradación aerobia y anaerobia de residuos orgánicos sólidos con el ensilaje de forrajes.
3) Similitudes y diferencias entre los procesos aerobios y anaerobios
4) En el caso de un tambo, ¿como se puede realizar la depuración de los efluentes? ¿Ha visitado alguna? ¿Cómo determinaría que el agua puede verterse finalmente al suelo o a causes de agua (ríos, arroyos)?
5) ¿Cómo definiría un *compost*? Y ¿cómo determinaría que el mismo está maduro, es decir pronto para su empleo en agricultura?
6) ¿Qué limitaciones encuentra en la aplicación de este proceso a mezclas de distintos sustratos que se pue-

den reunir en una ciudad? ¿Se puede lograr un producto final de composición similar?

7) ¿Se puede pasar de la escala de camellones (pilas largas y unos 2 m de altura) de residuos a una escala industrial? ¿Qué se requiere de infraestructura? Principales limitantes.

8) ¿Qué opinión le merece si le ofrecen un biofertilizante que presenta: malos olores, pH ligeramente ácido y más N-amonio en relación a N-nitrato?

9) Los biodigestores anaerobios pueden diseñarse en tamaños pequeños para ser aplicados en la industria. ¿Qué debe contener el llamado reactor? ¿Los tiempos en que ocurren las distintas etapas microbiológicas pueden descender?

10) ¿Cómo evaluaría la calidad de un biofertilizante?

11) ¿Qué exigencias mínimas se le debe exigir a estos productos?

12) Compare estos procesos de biodegradación (aerobia y anaerobia) con la degradación natural, en la naturaleza.

22 Degradación de xenobióticos

Un nuevo enfoque del ciclo del carbono en los suelos y aguas ha sido introducido como consecuencia del incremento en el uso de sustancias orgánicas sintéticas para el control de plagas.

Generalmente estas sustancias se denominan **xenobióticas** (*xeno*= extraño, *biótico*= vida).

Son compuestos orgánicos o minerales sintéticos, con estructura y comportamiento en el ambiente diferentes a las de la mayoría de las sustancias orgánicas naturales. Son introducidos en el ambiente por actividades del hombre a concentraciones que provocan efectos indeseables. Estos compuestos pueden ser degradados por reacciones abióticas y bióticas. Estas últimas, las microbianas, son más significativas en el ambiente ya que los sistemas enzimáticos aceleran el proceso de degradación y pueden conducir a una completa degradación o mineralización del agente polucionante.

Algunos de estos compuestos son liberados al ambiente por el hombre con el objeto de controlar plagas, caso de los **pesticidas, o agrotóxicos**, cuya persistencia y transformaciones reflejan su eficacia como producto y su peligro potencial para la microflora y la calidad del ambiente. Más de 1.000 de estos compuestos están registrados, desde moléculas simples como el bromuro de metilo (CH_3Br) hasta moléculas muy complejas como el aldrín. Cerca del 97% son herbicidas, insecticidas y fungicidas que representan 65, 25 y 7% respectivamente. Los restantes 3% corresponden nematicidas, acaricidas, etc. Otros son los aditivos en los plásticos (ftalatos), colorantes usados en teñidos de prendas de vestir y alimentos, impurezas en formulaciones de pesticidas (dioxinas cloradas) y solventes halogenados.

Otros xenobióticos provienen de la industria manufacturera, efluentes de industrias, aguas residuales, actividad de minas, de las industrias petrolera, del papel, agrícola. Los compuestos orgánicos: sintéticos e introducidos continuamente o los naturales, formados en la biosfera, se pueden dividir en dos categorías según su persistencia en el suelo:

Los **biodegradables** y aquellos que son resistentes a la biodegradación y se conocen como **recalcitrantes o refráctiles** que se degradan muy lentamente o no la hacen. La separación entre ambos grupos es muchas veces arbitraria, ya que ciertas moléculas orgánicas pueden ser biodegradables bajo ciertas condiciones del suelo, pero no en otras. Muchos compuestos sintéticos derivados de alcanos o simples compuestos aromáticos son más lentamente degradados en sedimentos de suelos inundados o bajo condiciones anaerobias, en relación a suelos bien aereados, lo que se explica por la necesidad del O_2 en las reacciones enzimáticas responsables de su degradación.

Se reconocen categorías en las sustancias recalcitrantes:
1- compuestos muy recalcitrantes
2- los que son sólo lentamente biodegradables
3- compuestos que pueden ser utilizados rápidamente por cultivos microbianos en el laboratorio, pero que no se sabe si lo pueden hacer en la naturaleza
4- compuestos aptos para microorganismos en cultivos axénicos y en uno o más habitats microbiano, pero que son persistentes en ciertas ocasiones.

Muchos **polímeros sintéticos** se encontrarían en la categoría 1.

La **lignina** es un ejemplo de la segunda categoría ya que es sustrato para algunos hongos aunque no es desasimilada rápidamente. Ciertos **hidrocarburos clorados** con carácter insecticida son ejemplos de la tercera categoría, ya que muchos son metabolizados en medios de cultivo, pero su mineralización a CO_2, H_2O y Cl_2 no ha sido demostrado *in situ*. En la última categoría se pueden ubicar algunos **hidrocarburos derivados del petróleo y constituyentes vegetales**.

En los últimos 50 años, se han producido en la industria más de 600.00 toneladas de sustancias orgánicas y se estima que un 15% han entrado al ambiente (Stevenson y Cole, 1999).

En términos de cantidad, los **xenobióticos orgánicos** son los más numerosos: 114 compuestos han sido designados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos como polucionantes, en 1982. Los más peligrosos son los **halogenados**, especialmente los aromáticos por sus efectos sobre la biocenosis y su carácter recalcitrante en el ambiente. Consecuentemente persisten en el suelo porque no son susceptibles de transformaciones biológicas a rangos normales.

El cuadro 1 muestra algunos ejemplos de compuestos orgánicos detectados en suelos y que representan potencial peligro para el ecosistema suelo-planta-hombre, muchos se reconocen o sospechan como cancerogénicos o mutagénicos. Los halogenados aromáticos ejercen efectos negativos en la microflora y son reconocidos recalcitrantes. Fueron introducidos por el hombre, de modo que se consideran verdaderos **xenobióticos**.

Como el suelo es el reservorio último de la mayoría de ellos, sus efectos sobre poblaciones microbianas y la acción de éstas sobre estas moléculas resulta de gran importancia en la determinación de sus consecuencias.

Una vez liberadas al ambiente la distribución de estas sustancias depende de:

- propiedades quimiodinámicas del producto
- propiedades físico-químicas del suelo
- su transferencia en las interfases suelo-agua y suelo-aire y a través de membranas biológicas

En la mayoría de los casos las sustancias orgánicas biodegradables sufren los mismos tipos de reacciones de ruptura y simplificación que las sintéticas, a saber: decarboxilación, desaminación, hidroxilación, ß-oxidación e hidrólisis de enlaces éster. Procesos bióticos y abióticos pueden transformar a los productos alterando su estado químico y consecuentemente su toxicidad y reactividad. Idealmente se espera su conversión a:

- CO_2, H_2O, minerales
- sustancias menos tóxicas

Pero se pueden formar productos **intermediarios** que se convierten en polucionantes tóxicos.

Las propiedades físicas y químicas de la molécula del polucionante afectan su biodegradación (cuadro 2). La mayoría de los compuestos orgánicos poseen grupos hidroxilos y carboxilos (–OH y –COOH) que son rápidamente oxidados.

Cuadro 1 – Ejemplo de importantes xenobióticos orgánicos

Tipo	**Ejemplos**
Alifáticos (halogenados)	tricloroetano, tricloro metano, cloruro de metilo, tetracloetano
Alifáticos(no halogenados)	acilonitrilo, tolueno, benceno, nitrobenceno,fenol cresol
Aromáticos (halogenados)	pentaclorofenol, clorobenceno hexaclorofenol, diclorobenceno
Policíclicos(no halogenados)	naftaleno, benzopireno, antraceno, bifenil, fenantraceno
Policíclicos (halogenados)	bifenilos policlorados (PCBs)
Pesticidas	lindano, toxafeno, DDT, 2,3-D dieldrin, heptaclorobenceno

Cuadro 2- Propiedades que alteran la biodegradación de compuestos orgánicos contaminantes

1	Carencia de oxígeno en su molécula (hidrocarburos)
2	Enlaces saturados (hidrocarburos alifáticos no satura dos y los aromáticos tienden a ser más rápidamente atacados que los no saturados)
3	Longitud de la cadena, los hidrocarburos alifáticos con cadenas laterales cortas son más rápidamente degradados que los hidrocarburos de más alto peso molecular
4	La polimerización de la molécula limita su biodegradación
5	Su escasa solubilidad en agua (moléculas hidrofóbicas)
6	La estructura y número de anillos aromáticos
7	El incremento de la ramificación de la molécula disminuye la biodegradación
8	El número y la posición de grupos halógenos, nitro,amino, sulfonato
9	El entrecruzamiento con otras moléculas impide llegar a las enzimas (complejo ligno-celulósico)
10	Volatilización
11	Solubilidad en agua
12	Moléculas orgánicas unidas a arcilla son más resistentes a la degradación (1g de la arcilla montmorillinolita presenta 600 m^2 de área superficial)
13	El complejo arcilla/humus puede inactivar exoenzimas (celulasa) o adsorber al sustrato
14	Ambientes extremos: temperatura, sequedad, pH, altas concentraciones de sal
15	Restricciones fisiológicas: carencia de las enzimas requeridas. Transporte de la sustancia en el suelo, limitación de nutrientes esenciales (N, S, P. etc.)

Un concepto muy popular en el pasado, antes de la década del 60, sostenía que esencialmente "**toda sustancia orgánica introducida en la biosfera debería ser metabolizada por los microorganismos en un período de tiempo razonablemente corto"**. Este concepto actualmente no es del todo correcto ya que vimos que hay sustancias sintéticas recalcitrantes y que persisten en el suelo en ciertas condiciones por largos períodos, como son los bifenilos policlorados, ciertos pesticidas (sobretodo los clorados), plásticos y polímeros sintéticos relacionados y un conjunto de derivados de la industria.

Convención de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes (COP)

El Convenio de Estocolmo surgió luego de largos años de negociaciones que permitieron alcanzar un compromiso de los países para eliminar a los llamados COP. Comenzó a regir en 2004 y la primera Conferencia de los países miembros, que tuvo lugar en Punta del Este, Uruguay, en mayo de 2005 definió en un principio los 12 los productos considerados "sucios" (cuadro 3) y sobre los que se piensa que deben tomarse medidas urgentes para erradicarlos del planeta en un plazo que los expertos no pueden precisar. La lista de estos productos genera desechos altamente peligrosos para la salud humana y pueden provocar su muerte o generar enfermedades y malformaciones tanto en el hombre como en otras especies animales.

Cuadro 3- Contaminantes orgánicos persistentes (COP)

Aldrin	Plaguicida usado en varios cultivos
Bifenilos policlorados	Compuestos usados como aditivos en productos de la industria gráfica, entre otras
Clordano	De uso agrícola
DDT	Uno de los más conocidos insecticidas, con numerosas aplicaciones
Dieldrin	Insecticida, contra termitas
Dioxinas	Generadas por combustión en la fabricación de plaguicidas, entre otros
Endrin	Insecticida empleado en algunos cultivos y contra roedores
Furanos	Compuestos producidos por diversas emisiones como incineradores y automóviles
Heptaclorobenceno	Insecticida
Hexaclorobenceno	Herbicida, contra malezas
Mirex	Insecticida y usado también en productos plásticos
Toxafeno	Insecticida usado en ciertos cultivos de cereales y hortalizas

Precisamente, el citado Convenio de Estocolmo apunta sus esfuerzos en dotar a los países que lo necesiten de asistencia tanto técnica como financiera para disminuir en primera instancia las emisiones nocivas de los COP y se intenta que la Organización de las Naciones Unidas (ONU) impulse la eliminación de al menos estos 12 contaminantes persistentes, mediante la prohibición de su producción, exportación e importación.

Efecto sobre la microflora del suelo

El efecto de estas sustancias en segmentos de la población dependerá de:

- su composición química, dosis, métodos de aplicación
- parámetros físico-químicos del ambiente, como pH, temperatura, agua

No existen muchos datos cuantitativos sobre las transformaciones de muchos de estos productos tóxicos, salvo, quizá, lo referente a los **pesticidas,** sobre los cuales las investigaciones son más abundantes. Los xenobióticos interfieren con procesos importantes como:

- fotosíntesis
- metabolismos oxidativos
- síntesis celulares
- algunos, como los derivados clorados actúan sobre la composición de la membrana celular, alterando su permeabilidad y la fisiología celular

Los **métodos** empleados para estudiar sus efectos son los clásicos en estudios de ecología microbiana (capítulo 8) y Anexo práctico, pero en las últimas revisiones sobre el tema se destaca la necesidad de estandarizar las técnicas que reflejan los efectos de estas sustancias sobre grupos y procesos microbianos de importancia para la continuidad de los ciclos de los elementos en la naturaleza.

Pesticidas

Su empleo se ha incrementado en los últimos años y tanto la agricultura moderna, como la conservación de frutas y verduras para la exportación, la lucha contra insectos, etc. liberan en los ecosistemas naturales grandes cantidades de sustancias de lenta biodegradación.

Las investigaciones sobre el efecto de muchos de estas sustancias en las comunidades microbianas naturales y sobre los mecanismos de degradación se han estimulado por los riesgos reales o potenciales asociados con el empleo indiscriminado de los xenobióticos.

Los pesticidas son sustancias químicas destinadas al control de poblaciones no deseadas (pestes), de muy distintos grupos taxonómicos y se caracterizan por los organismos que atacan: **insecticidas, nematicidas, herbicidas, fungicidas.** Otros, destinados a la supresión de roedores y moluscos, han recibido menos atención**.**

En muchos países no se llevan estadísticas sobre el uso de estas sustancias y debemos remitirnos a las cifras sobre sus importaciones. El empleo masivo de herbicidas selectivos comenzó hacia la mitad de la década del 40, luego del descubrimiento del 2,4-D, pero el control químico de malezas está aún poco desarrollado, si se lo compara a los logros en el mejoramiento vegetal y con otros aspectos de las ciencias del suelo. Se pretende lograr que un agente químico específico actúe selectivamente sobre una determinada planta. Los métodos de control de malezas son numerosos: físicos o mecánicos (competencia por el cultivo, rotaciones), biológicos, químicos, el fuego, etcétera.

Muchas de estas sustancias, sobre todo los **herbicidas,** se aplican directamente en la superficie o llegan a las capas superficiales del suelo, otros se pulverizan sobre el follaje, pero se ponen en contacto con los microorganismos al caer las hojas o cuando las plantas mueren. Estas aplicaciones pueden alcanzar zonas vecinas cuando las moléculas son volátiles. El agua de riego puede contaminarse, constituyendo ésta otra vía de entrada al suelo.

Las **interacciones** entre los pesticidas y los microorganismos serán analizadas desde dos puntos de vista:

- **sobre los microorganismos:** estas sustancias pueden afectar habitantes no patógenos de los ecosistemas naturales, o sus interacciones con el consiguiente efecto sobre

procesos benéficos (degradación de materia orgánica, nitrificación, fijación del N_2, solubilización de fosfatos)

- **sobre los pesticidas:** los microorganismos de estos ambientes metabolizarán a estas sustancias (la mayoría son orgánicas) por distintos mecanismos, los que sumados a las otras causas abiológicas de alteración, contribuyen a disminuir sus efectos tóxicos.

Como **generalización,** se piensa que:

- los compuestos de amplio rango, como los fumigantes, fungicidas, parecen afectar negativamente todos los procesos biológicos, al menos temporariamente. El mismo efecto se encontró con la mayoría de los metales pesados

- herbicidas, insecticidas, son menos perjudiciales para la microflora y en algunos casos, pueden estimularla.

Entre los procesos: la nitrificación es altamente sensible, mientras que la mineralización del nitrógeno es bastante resistente.

La eficacia de un pesticida se determina por la **dosis letal**, que asegura la muerte de la población entera y la **dosis letal 50 (DL 50),** que elimina al 50% de los componentes de la población. En respuesta al efecto causado por los pesticidas, los microorganismos muestran gran adaptabilidad, evidenciada por el rápido restablecimiento de la actividad metabólica.

Los **mecanismos** pueden ser:

- reemplazo de especies sensibles por otras tolerantes, muy frecuente en el caso de especies de rhizobios

- por una rápida recolonización del ambiente luego de los tratamientos biocidas

Evaluación de efectos inhibidores o tóxicos

Numerosos estudios se han realizado en torno a los efectos laterales de los pesticidas sobre los microorganismos y sobre sus interacciones. La aplicabilidad de estos resultados obtenidos a nivel de laboratorio a las condiciones naturales de campo, resulta muchas veces difícil porque:

- los estudios fueron realizados bajo condiciones muy diversas, muchas veces no correctamente explicitadas en los trabajos

- en ambientes y tipos de suelos muy diferentes

- falta de información sobre la formulación de productos comerciales y sus aditivos, que pueden afectar a la población en mayor grado que el producto mismo.

El efecto de un pesticida sobre la microflora se evalúa frecuentemente en el laboratorio, bajo condiciones controladas. En estos casos la determinación de la dosis que actúa sobre los organismos resulta difícil de precisar, sobre todo con pesticidas volátiles.

Cuando las sustancias son fuertemente adsorbidas en los coloides del suelo, se pueden acumular altas concentraciones en las capas superficiales. La concentración puede ser más alta en la zona de la corona, por movilización del producto por los tallos. En esa zona la actividad biológica es grande y actúan gran número de patógenos.

Con sustancias muy adsorbidas, se emplean dosis altas en los modelos experimentales, como reflejo de la práctica de campo.

El estudio de la **biodegradación** de sustancias con carácter biocida no es sencillo en aguas, suelos, alimentos, ya que muchas veces las concentraciones son muy bajas, del orden de las partes por millón (mg/kg).

Métodos

Químicos: se deben emplear técnicas muy sensibles: cromatografía en fase gaseosa o líquida, espectrofotometría con luz ultravioleta, para detectar trazas de pesticidas o de sus intermediarios en la degradación.

Biológicos: actividad respiratoria, el desprendimiento de CO_2 o el consumo de O_2 de muestras de suelo o aguas tratadas con el producto en estudio y algún sustrato cuya transformación se desea seguir, glucosa, celulosa, **bio-**

masa microbiana, por recuentos o por la técnica de fumigación-incubación, **recuentos de grupos microbianos** que realizan procesos de interés para el ambiente (FBN, solubilizadores, mineralizantes, etc.)**, actividad enzimática**: deshidrogenasas, amilasas, fosfatasas, ATPasas, etc., **procesos microbianos,** como la FBN, mineralización, oxido-reducción, son evaluados antes y después de la incorporación de estas sustancias**.**

Pesticidas en el suelo

La figura 1 presenta un esquema de las posibles vías a seguir por un pesticida cuando llega al suelo. Pongamos como ejemplo el caso de la incorporación de un herbicida. Este se puede perder por lavado, por degradación en el suelo, o ser absorbido por los cultivos. El período en que un pesticida persiste en el suelo es de gran importancia práctica, ya que refleja el tiempo en que la plaga o peste estará sometida a control, afectando también la polución del ambiente: acumulación en porciones comestibles de las plantas, en corrientes de agua, transporte a pájaros vía lombrices, etcétera.

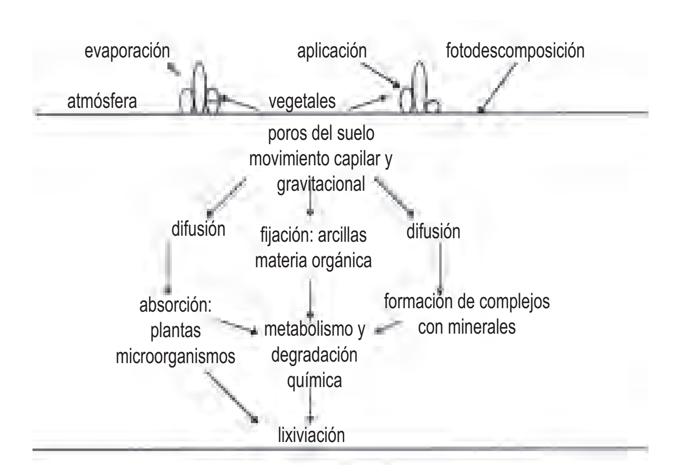


Figura 1- Esquema del comportamiento de un pesticida en el suelo

La **persistencia** en el suelo, es decir la duración de la efectividad de un pesticida, depende de

- **su composición química**
- **de las condiciones del medio:** materia orgánica, arcillas, pH, humedad, tipo de suelo, etcétera.

En el efecto biológico de un pesticida (B) interviene su concentración y la duración de su acción.

$$B = K\,i \int c\,dt$$

Donde c es la concentración en un momento dado (dt); K es un factor que depende del suelo (humedad, coloides, etc.).

La **persistencia** en ambientes naturales depende de varios factores: la descomposición química y biológica, la adsorción a coloides, el lavado. la volatilización, la fotodescomposición, la remoción por vegetales que se cosechan. El cuadro 4 muestra los procesos que en el suelo afectan a sustancias xenobióticas

Cuadro 4 - Procesos que afectan a xenobióticos en el suelo

Proceso	Factores que inciden
hidrólisis	pH
transformación microbiana	enzimas degradativas, condiciones ambientales apropiadas
volatilización	presión de vapor
óxido-reducción	Eh
lavado	solubilidad
adsorción	coeficiente de partición pKa, solubilidad, tipos de adsorbentes
bioconcentración	coeficiente de partición pKa
fijación/adsorción	CIC

La estructura de la molécula, la posición y naturaleza de los grupos funcionales afectan también la persistencia, como se aprecia en cuadro 5.

Descomposición microbiana

Durante mucho tiempo se pensó que los mecanismos de degradación de los pesticidas por los microorganismos eran similares a los de los animales. Pero a medida que las investigaciones fueron progresando, se apreciaron las diferencias:

- en los animales las reacciones conducen sobre todo a convertir estas moléculas en formas polares y por lo

tanto son liberadas y los procesos ocurren en órganos especializados, como el hígado

- en los microorganismos, el objeto principal es la obtención de energía y muy pocas moléculas (algunos halogenados aromáticos usados como insecticidas) no son atacadas por algún grupo de microorganismo, en el suelo. Se propuso un esquema general sobre la acción de los microorganismos y de procesos abiológicos, sobre los pesticidas (cuadro 6).

Cuadro 5 - Influencia de la estructura en la biodegradación de xenobióticos

Tipo de compuesto o sustituyentes	Más degradable	Menos degradable
hidrocarburos	alcanos superiores (12 C)	alcanos inferiores
	alcanos	alcanos de alto PM
	alifáticos de cadenas lineales	alifáticos ramificados
	aromáticos mono y bi cíclicos	aromáticos policíclicos aromáticos
aromáticos sustituídos	-OH	-F
	-COOH	-Cl
	$-NH_2$	-Br
	$-OCH_3$	$-NO_2$
alifáticos clorados	-Cl más 6 C desde el C terminal	-Cl menos 6 C

Una microflora especializada es responsable de la degradación de los pesticidas mediante dos mecanismos diferentes:

I. la sustancia favorece el crecimiento y es empleada como fuente de carbono, energía y ocasionalmente de nitrógeno, azufre, etc. El número de especies activas aumenta y el aislamiento se puede efectuar en medios de cultivo en donde el pesticida actúa como única fuente de nutrientes. Una vez que el producto es degradado, la población declina

II. cometabolismo: el compuesto no actúa directamente como fuente de nutrientes, sino que debe emplear otras, como glucosa, por ejemplo, que al disminuir en el medio inducen las enzimas necesarias para la degradación del pesticida.

Cuando el nivel de pesticida es bajo en relación a otras fuentes de carbono, el metabolismo incidental, dentro del cual se ubica el cometabolismo, es la forma principal de actividad microbiana.

Las reacciones catabólicas ocurren sobre todo cuando las dosis de pesticidas son altas y la estructura química permite su biodegradación y su uso como fuente de carbono.

Cuadro 6 - Metabolismos microbianos sobre pesticidas

I. Enzimático
A. Metabolismo incidental: los pesticidas no se usan directamente como fuente de energía.
1. metabolismo por enzimas generalmente disponibles
a. enzimas de amplio espectro (hidrolasas, oxidasas, etc.)
b. enzimas específicas presentes en muchas especies
2. metabolismo inducido por productos análogos (cometabolismo)
c. enzimas que emplean sustratos estructuralmente similares a los de los pesticidas.
B. Catabolismo: los pesticidas se emplean como fuente de energía
d. pesticidas o parte de su molécula son rápidamente usados
e. deben inducirse enzimas específicas para su degradación
C. Detoxificación.
f. metabolismo por microorganismos resistentes
II. No enzimático
A. Participación en reacciones fotoquímicas
B. Contribución por cambios de pH
C. Por la producción de reactantes orgánicos o inorgánicos
D. Por la producción de cofactores

Procesos microbianos sobre pesticidas

Mecanismos generales de biodegradación

- **detoxificación**, conversión de moléculas tóxicas en no tóxicas

- **degradación**, o transformación de sustancias complejas en productos simples (puede ser sinónimo de mineralización, con aparición de CO_2, H_2O, NH_3, etc.)

- **conjugación** o formación de complejos, por reacciones de adición; el microorganismo combina el pesticida con metabolitos celulares (adición de aminoácido, ácidos orgánicos, metilos, etc.); pueden conducir a bajar la toxicidad

- **activación:** conversión de un producto no tóxico en moléculas tóxicas: preparaciones comerciales, como el herbicida 4 (2,4-DB) que en el suelo se transforma en metabolito tóxico para malezas (2,4-D)

- **cambio en espectro de toxicidad**: sustancias específicas para un grupo de organismos, se metabolizan y dan productos que inhiben a otros organismos, como la conversión en el suelo del fungicida pentacloro benzol en ácido pentacloro benzoico, que actúa como herbicida

- **simplificación**: conversión de molécula no tóxica, que puede convertirse en pesticida cuando es activada enzimáticamente, en producto no tóxico, fácilmente degradado.

La figura 2 reagrupa estos conceptos en el ejemplo del metabolismo de herbicidas fenoxialcanos.

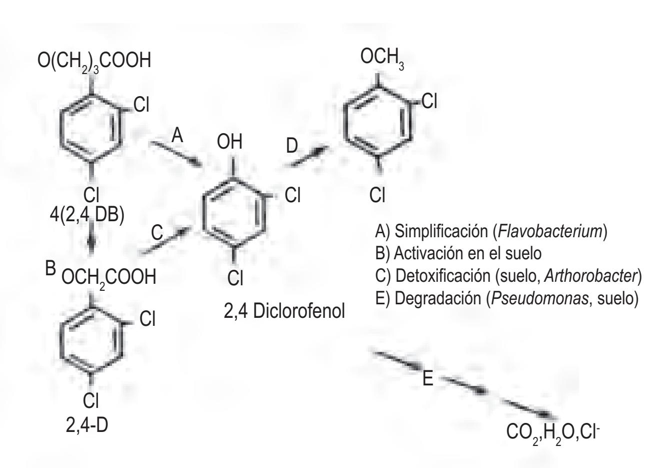


Figura 2- Pasos iniciales en el metabolismo de herbicidas fenoxialcanos

Descomposición química

Mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis se pueden degradar pesticidas, mientras que otros pueden ser activados. Así, el cianato de potasio y el dalapón se hidrolizan lentamente en agua, resultando entonces inefectivos como herbicidas. En suelos en ambiente anaerobio, la degradación puede ser química y microbiológica.

Adsorción a coloides

Son retenidos a la materia orgánica (humus) y a la fracción arcilla, y los óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio juegan importante rol en suelos pobres en materia orgánica. En escala descendente de capacidad de adsorción tendríamos: humus > montmorillonita > illita > caolinita, pero intervienen también la temperatura, el pH, la capacidad de intercambio catiónico. Los enlaces pueden ser de naturaleza física (fuerzas de Van der Waals) o electrostáticos, por puentes de hidrógeno, sobre todo en moléculas con grupos -NH, como los fenilcarbamatos y las ureas sustituidas. Intervienen también enlaces en complejos con iones metálicos, inactivándose muchas moléculas fijadas.

Así, suelos con alto nivel de materia orgánica requieren dosis relativamente mayores de la mayoría de los herbicidas y suelos arcillosos niveles superiores a los arenosos. Para predecir las dosis de herbicidas que es necesario aplicar en varios tipos de suelos, se han desarrollado modelos matemáticos. El nivel de materia orgánica es uno de los parámetros del suelo que ofrece las mejores correlaciones entre la adsorción de herbicidas y propiedades edáficas. El carbón activado, uno de los materiales absorbentes más potentes, se emplea para proteger a las semillas de la acción de los herbicidas.

Lavado

Los herbicidas de pre-emergencia que se aplican generalmente en la superficie del suelo pueden ser llevados por el agua a capas sub-superficiales donde germinan la mayoría de las semillas de malezas, que son así eliminadas por estas sustancias. Las semillas grandes deben sembrarse debajo del área de alta concentración del herbicida, o bien ser resistentes a ellos. El grado de lixivia-

ción dependerá de las relaciones de adsorción entre los herbicidas y el suelo, su solubilidad en agua y la cantidad de agua que atraviesa el suelo. En base a estos parámetros se puede calcular la dosis requerida en una situación dada.

Volatilización

Los ésteres del 2,4-D son volátiles y sus vapores pueden perjudicar a otros cultivos. Estas sustancias se movilizan en los poros del suelo como los gases, y su concentración se puede medir por destilación del agua que se evapora en la superficie del suelo. Constituye una pérdida importante, si se consideran los volúmenes de agua que se pierden.

Los principales factores que afectan la volatilidad son: el grado de adsorción al suelo, la temperatura, el viento, la tensión de vapor.

Fotodescomposición

Muchos herbicidas absorben en el rango del ultravioleta, pero la radiación solar con longitudes de onda menores de 295 nm que llega al suelo es despreciable. El efecto sobre los biocidas está limitado a la superficie de suelos y aguas; sólo serán atacados (liberación de electrones, formación de puentes) los pesticidas no incorporados o los que ascienden por capilaridad en épocas secas. Puede ocurrir también cierta «sensibilización»: la energía es absorbida por un intermediario y transferida a la molécula herbicida por colisión, la que es así dañada. Los productos de la fotodescomposición pueden ser similares a los obtenidos por degradación.

Remoción por los cultivos

Ciertos cultivos se siembran con el objeto de absorber herbicidas persistentes en suelos donde se aplicaron en altas concentraciones para eliminar toda la vegetación, para sembrar luego plantas ornamentales. El maíz se usa para eliminar simazina y atrazina (capítulo 23).

Persistencia en el ambiente

Como hemos visto depende del tipo del suelo, de la calidad de las aguas, la temperatura, la humedad, materia orgánica, coloides minerales, actividad biológica. Se puede evaluar en ensayos controlados o de campo. Se citan datos de que sólo un 27 % de la variabilidad encontrada en las pérdidas de Picloram en 11 suelos, en condiciones controladas, pudo relacionarse a las propiedades de los mismos. El cuadro 7 (Stevenson y Cole, 1999) muestra la gran persistencia de insecticidas organoclorados, sobretodo DDT. Como resultado de su pobre degradación, su empleo está muy restringido y aun prohibida su producción y distribución. La fórmula de algunos de los más persistentes pesticidas se presentan en la figura 3 (Alexander, 1994).

Cuadro 7- Persistencia en el suelo de algunos pesticidas

Pesticida		Persistencia en el suelo Meses	Años
Insecticidas fosforados		3	
Herbicidas con ácidos alifáticos y carbamatos		3	
Herbicidas con grupos nitrito, fenoxi, toluidina		6	
Herbicidas con ácido benzoico, amidas		12	
Herbicidas derivados de la urea, triazina, picloram		18	
Insecticidas organoclorados			
	Chlordano	Más de 18	
	DDT		5
	Dieldrin		4
	Aldrin		3
	hetacloro		2

Los datos de temperatura y humedad son más útiles para predecir la desaparición de un pesticida que el tipo de suelo. La velocidad de degradación aumenta con la temperatura y la humedad.

La evaluación en el campo exige numerosos ensayos, con aplicaciones en distintas épocas y durante varios años.

Contando con amplia información sobre datos de lluvias, evaporación, temperatura, residuos de pesticidas, duran-

te varios años, se obtienen mediante modelos de predicción, curvas de desaparición simuladas de estas sustancias.

En general, la concordancia entre valores observados y simulados es buena y su empleo resulta muy útil, sobre todo si se consideran las dificultades en la toma de muestras representativas en el campo, la variabilidad asociada en la determinación de cantidades pequeñas, etc.

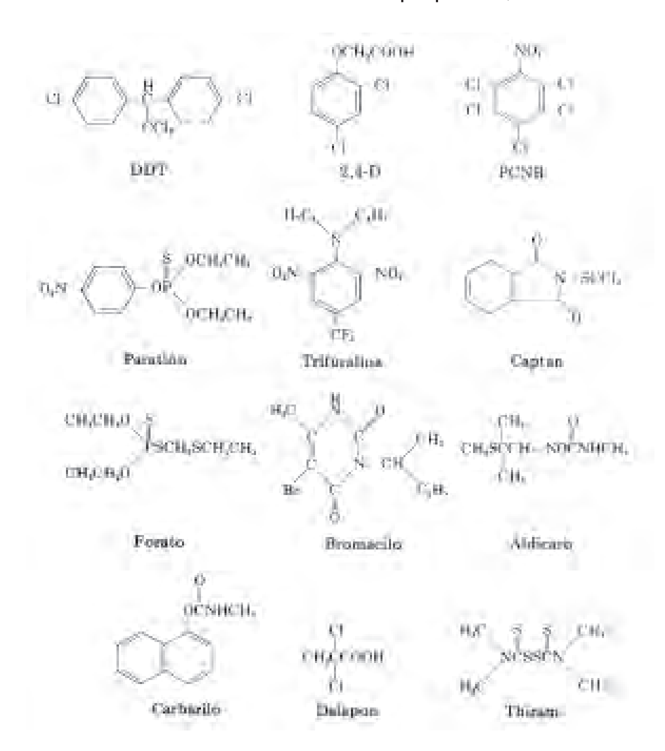


Figura 3- Estructura química de algunos de los pesticidas más persistentes en el suelo

Acción de los pesticidas sobre la microflora

La bibliografía señala innumerables citas relativas a casos de supresión o inhibición de algún grupo importante de microorganismos por efecto de pesticidas.

Efectos

- **modificación del espectro de especies dominantes**, pueden se suprimidos géneros comunes y aparecer otros resistentes. Estos cambios pueden ser de corta duración, aunque la población puede ser afectada en algunos casos por largos períodos

- **grados de susceptibilidad:** una especie puede declinar apreciablemente, una segunda puede alterarse sólo ligeramente y otras pueden resistir el efecto del pesticida. Las hifas de los hongos y las células vegetativas de las bacterias son aún más afectadas que los conidios o esclerocios de los hongos o que las endosporas bacterianas

- **efecto en interacciones biológicas:** algunos fungicidas pueden provocar estimulación en la incidencia de enfermedades, hecho que se atribuye a inhibición de poblaciones que compiten con la especie perjudicial y a la proliferación de poblaciones antagónicas

- **efectos sobre procesos microbianos**: en las transformaciones de compuestos nitrogenados, se puede generalizar que, salvo en el caso de fungicidas presentes en el suelo en alta concentración, la **mineralización y la desnitrificación** no son muy afectadas, mientras que la **nitrificación** es uno de los procesos más sensibles, acumulándose amonio. Esta sensibilidad de los nitrificantes autótrofos se usa para evaluar los efectos tóxicos de diferentes dosis de pesticidas, mediante la evaluación de los nitratos

Cuadro 8 - Rendimiento y contenido de nitrógeno en leguminosas inoculadas y tratadas con pesticidas en el invernáculo (mg/planta)

	Semillas tratadas		Semillas no tratadas	
Inoculante	**rendimiento**	**N**	**rendimiento**	**N**
		alfalfa con thiram		
ninguno	270	5,9	290	6,8
Rhizobio sensible	280	6,6	440	12,2
Rhizobio resistente	490	13,2	500	14,6
		caupi con phygon		
ninguno	1150	21,7	1100	23,2
Rhizobio sensible	1820	36,4	3820	97,0
Rhizobio resistente	3930	105	3790	106

La **nodulación y la fijación del nitrógeno** en leguminosas pueden ser afectadas por pesticidas, sobre todo por aquellos aplicados a las semillas que además se inoculan con rhizobios específicos. Se propone separar en el tiempo las aplicaciones de inoculante y fungicida o trabajar con mutantes de rizobios resistentes a los pesticidas más empleados. El cuadro 8 evidencia la importancia de esta línea de trabajo.

Se informó de marcada inhibición de la actividad nitrogenásica en la rizosfera de 25 variedades de sorgo, cuando se emplearon dosis tres veces superiores a las normales de atrazina (4,5 kg/ha)(Frioni, 1999), efecto que desapareció en otro ensayo de campo, en Argentina, sin herbicida. En el mismo cultivo, se comprobó en otro ensayo con aplicaciones de distintas dosis de tres herbicidas: atrazina, linurón y 2,4-D amina, que la celulolisis fue inhibida por todos los tratamientos pesticidas. Este efecto fue observado por otros autores y se atribuye a la falta de sustratos carbonados (las malezas son suprimidas) y a una inhibición selectiva de la celulasa.

Numerosas revisiones incluyen determinaciones de efectos sobre procesos biológicos como respiración, mineralización del nitrógeno, nitrificación, datos sobre recuentos de ciertos grupos de microorganismos, evaluación del ATP de origen microbiano, enzimas específicas (deshidrogenasas, celulasa, amilasa, etc.), fijación del nitrógeno. Se propuso un programa de análisis a los que deben ser sometidos los pesticidas antes de que su distribución sea autorizada por autoridades competentes, donde se incluyen estudios sobre la población normal del suelo, además de los clásicos controles sobre sanidad humana y vegetal:

1. **Actividad respiratoria** (CO_2, O_2) evaluada en el laboratorio en muestras de suelo: sin aditivos (respiración endógena), con glucosa (proceso activado por el desarrollo microbiano) y con restos vegetales (degradación de materia orgánica compleja por sucesiones microbianas).

2. **Transformaciones del nitrógeno**: amonificación, nitrificación.

3. **Fijación simbiótica del N_2**, en macetas: nodulación: número, peso, tamaño, actividad nodular, rendimiento vegetal.

4. **Microorganismos particulares y antagonismos**: micorrizas, patógenos vegetales, antagonistas.

5. **Estabilidad de agregados** y mejoramiento de la estructura.

Los estudios incluyen distintas dosis de los productos, formas de aplicación: incorporación, pulverización, etcétera. Es muy importante realizar experiencias a nivel de campo; ya que resulta casi imposible correlacionar resultados obtenidos bajo condiciones controladas con los logrados cuando estas sustancias llegan al suelo, en condiciones naturales.

Cuando se observan efectos laterales en ensayos de laboratorio, los pesticidas deben llevarse a la naturaleza y realizar allí las observaciones, aunque estos trabajos son largos y se debe considerar el efecto del ambiente (temperatura, humedad, nutrientes) sobre las propiedades biológicas que evaluamos, afectadas además por los pesticidas.

En resumen: se puede señalar que raramente la agricultura moderna dejará de emplear estos productos para lograr incrementar los rendimientos. Reconocida la toxicidad de la mayoría de ellas para el hombre, animales y microorganismos, es de esperar que se empleen conscientemente por los técnicos y productores y en las dosis recomendadas, evitando contaminar recursos tan importantes como suelos y aguas, con productos altamente tóxicos y escasamente biodegradables.

Los agroquímicos parecen no ejercer efectos de larga duración en actividades microbianas del suelo cuando se aplican a dosis recomendadas. Sin embargo, al emplearlas a dosis superiores, provocan efectos negativos, de corta duración, particularmente sobre transformaciones del carbono y del nitrógeno.

Las prácticas de control de plagas incluyen cada vez más las técnicas de **Control Biológico,** empleando microorganismos antagonistas de fitopatógenos (capítulo 17).

Xenobióticos inorgánicos

Muchos compuestos inorgánicos se forman como desechos en las industrias modernas, como anhídridos de S y N y las sales de metales pesados, que se consideran xenobióticos por la elevada concentración liberada en ambientes naturales, sobre todo aguas y suelo y los efectos deletéreos que ejercen en la biosfera. A pesar de que muchos metales son abundantes en la corteza de la tierra, las actividades del hombre, como la combustión de petróleo y derivados, minas y prácticas agrícolas, frecuentemente incrementan su concentración a niveles tóxicos. Entre los metales tóxicos a alta concentración se incluye el arsénico, boro, cadmio, cromo, cobre, plomo, mercurio, molibdeno, níquel, selenio, zinc, vanadio.

La aplicación de abonos orgánicos puede conducir a la acumulación de metales en el suelo, muchos de los cuales pueden ser tóxicos para los animales y el hombre.

El cuadro 9 (Stevenson y Cole, 1999) presenta los niveles en minerales en abonos obtenidos por biodegradación anaerobia y por compostaje.

Cuadro 9- Rangos en la acumulación de elementos minerales (mg/kg) en dos tipos de abonos orgánicos

Mineral	**Biofertilizante**	***Compost***
As	6-230	1-4,8
Cd	4-846	1-13,2
Cr	17-99.000	8,2-130
Hg	1-10.600	0,5-3,7
Ni	10-3.500	7-100
Pb	13-19.700	22-913

Muchos países impiden el uso de abonos orgánicos a los suelos si estos contienen metales pesados para evitar su acumulación luego de varios años de aplicación. Compuestos orgánicos solubles en agua pueden formar complejos organo-metálicos y desplazar los metales en el suelo y hacia aguas freáticas, incrementando los riesgos de contaminación.

Los microorganismos poseen la capacidad de transformar elementos minerales, por ejemplo, al usarlos como fuente de energía (Fe^{++} a Fe^{+++} por *Thiobacillus*), aceptor de electrones (Mn^{+4} a Mn^{+2} por *Bacillus*), oxidación (As), alquilación ($CH_3^- + Hg^{+2} \longrightarrow CH_3Hg^-$, por *Clostridium*).

Efecto del suelo y las plantas sobre los metales tóxicos

Numerosas prácticas culturales se han implementado para controlar el ciclo de los minerales en el suelo, como aquellas que disminuyen su disponibilidad por encalado que eleva el pH o la incorporación de residuos vegetales y otros materiales ricos en materia orgánica que facilitan la quelación de los mismos (complejos organo-metálicos), la arada profunda que baja su concentración en la superficie y la selección de plantas por sus características de enraizamiento (del tipo profundo) y con reducida capacidad de asimilar y acumular metales tóxicos en la porción cosechable del cultivo.

La selección vegetal es muy importante ya que distintas especies en un mismo suelo presentan marcadas diferencias en la concentración de elementos traza.

Finalmente, **la materia orgánica** ejerce un efecto tampón mejorando los efectos adversos de los metales introducidos al suelo como contaminantes. El plomo y el cadmio, son contaminantes altamente tóxicos que se introducen al suelo en grandes cantidades a partir de deposiciones de la atmósfera, en ecosistemas agrícolas y forestales. Pero se ha visto que gran parte es inmovilizado por formación de complejos con la materia orgánica en el suelo forestal, enriqueciendo las capas orgánicas con metales pesados. Existe el temor de que el Pb y el Cd puedan eventualmente ser movilizados y transportados a causes de agua como complejos solubles (Stevenson y Cole, 1999).

Los **vegetales** se emplean también para depurar un ambiente (suelo, aguas) de metales pesados. La acción la ejercen o bien los microorganismos de su rizosfera o las propias plantas hiperacumulan los metales pesados (capítulo 23). Estas plantas (acuáticas como los camalotes, otras especies herbáceas como maíz, sorgo) deben eliminarse del ambiente y tratarse en usinas especializadas.

No ocurre lo mismo con árboles, ya que los metales quedan en la madera, que no integra la cadena trófica.

Resumen: grandes cantidades de residuos se generan cada año por actividades domésticas, agrícolas e industriales que deben ser manejados a los efectos de evitar severos efectos contaminantes en el ambiente. Un conjunto de sustancias químicas, conocidas como recalcitrantes, de muy lenta degradación son introducidas deliberadamente o por accidente en los causes de aguas y en los suelos y pueden persistir por largos períodos de tiempo. Su persistencia es incrementada por su adsorción a la materia orgánica o a la fracción mineral del suelo. Resulta de suma importancia el conocimiento de los efectos de una nueva sustancia, por ejemplo un pesticida, sobre los principales grupos y procesos microbianos, además de manifestar su inocuidad sobre el hombre, antes de recomendar su comercialización y empleo.

Bibliografía

Alexander, M. **Biodegradation and bioremediation.** 1994 Academic Press, San Diego, California, USA.

Alexander, M. **Introducción a la microbiología del suelo**.1994. AGT Editor, S.A. 491 pp.

Balba, M. T. Microorganisms and detoxification of industrial waste. En: **Exploitation of Microorganisms**, 1993, D. G. Jones (ed), Chapman & Hall, London: 371-410

Barkay, T., D. F. Schearer y B. H. Olson **Toxicity Testing Using Microorganisms**, 1986, B. J. Dutka y G. Bitton (eds) vol 2, CRC Press, Boca Raton, Florida: 133-135

Frioni, L. **Procesos microbianos**. 1999 Fundación de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

Hickey, W. J. Biochemistry and Metabolism of Xenobiotic Chemicals. En: **Principles and Applications of Soil Microbiology.** 1998, Sylvia, Fuhrmann, Hartel y Zuberer (eds), Prentice Hall, N. Jersey: 447-468

Hicks, R. J., G. Stotzky y P. Van Voris. Review and Evaluation of the Effects of Xenobiotic Chemicals on Microorganisms in Soil. En: **Advances in Applied Microbiology**, 1990 vol 35: 195-253

Siqueira, J. O., F. M. de S. Moreira, B. M. Grisi, M. Hungria y R. S. Araujo **Microorganisms e Processos Biológicos do Solo: Perspectiva Ambiental,** 1994, EMBRAPA-SPI, Brasilia, DF

Stevenson, F. J. y Cole, M. A. **Cycles of Soil, Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients,** 1999**,** Wiley & Sons, New York

Preguntas de repaso

1) Cite ejemplos de sustancias denominadas recalcitrantes, de origen natural y sintéticas
2) ¿Qué destino tienen en la naturaleza?
3) Alternativas de biodegradación de pesticidas en el suelo
4) Mecanismos físicos, químicos y biológicos que puedan explicar la desaparición de un pesticida agregado al suelo
5) ¿Por qué los microorganismos son usados como organismos *test* para determinar el efecto de un nuevo producto a ser liberado a la naturaleza?
6) Señale algún método que permita evaluar el efecto de una nueva sustancia usada como fertilizante, en la microflora del suelo
7) Discuta los procesos de degradación de un polucionante por metabolismo normal y por cometabolismo
8) ¿En qué situaciones puede incrementarse el nivel de metales pesados en un suelo?
9) Precauciones a tener en cuenta al respecto:
10) Señale algún mecanismo para la eliminación de metales (Cd, Hg, Cr) del suelo

23 Biorremediación

En este capítulo se analizarán algunas de las estrategias biológicas para restaurar suelos y aguas contaminadas y llevarlos a un estado no tóxico, llamado también "estado saludable". Un ambiente sano es esencial no solo para sostener la producción de alimentos para los habitantes del planeta, sino también para brindar una buena calidad de vida. A través del análisis de algunos casos, se ilustrará sobre los mecanismos de biodepuración aplicados.

La **biorremediación**, término no traducido al español, consiste en la aplicación de un conjunto de técnicas que permiten aumentar la biomasa microbiana del suelo y las actividades de los microorganismos y vegetales con el objeto de lograr la recuperación de ambientes polucionados o contaminados. En particular se estimula la biodegradación de productos con carácter xenobiótico, originados por actividades del hombre y que contaminan el ambiente.

Bajo esta denominación se agrupan una variedad de procesos de biotratamiento que varían en sus mecanismos de acción:

- mineralización
- transformación parcial de moléculas tóxicas a otras sin toxicidad
- humificación
- alteración del potencial redox
- compostaje

Algunos de los problemas de polución ambiental pueden resolverse por estos mecanismos: cerca de 300 compuestos polucionantes del suelo se consideran factibles de biodegradación microbiana, por lo que la bioremediación se aplica en ambientes contaminados por:

- derramamiento de petróleo bruto e hidrocarburos derivados (benceno, xileno, tolueno, policíclicos, etc.)
- solventes diversos (clorados, como el tricloroetileno, acetona, butanol, etilenglicol, cloruro de metilo)
- otros: pentaclorofenol, TNT, halógenos, pesticidas
- metales, como mercurio, plomo, cadmio
- radiactivos, como el radio, plutonio
- pesticidas, como 2,4-D, atrazina, malation
- bifenilos policlorados como el araclor

Estos contaminantes son introducidos a ambientes naturales por las actividades del hombre. Algunos entran intencionalmente al suelo, como los pesticidas, o accidentalmente, como los hidrocarburos, por pérdidas de tanques, fugas en los sistemas de transporte.

Si bien en nuestro país, este no es un problema muy grave, han ocurrido accidentes en relación a derrames de petróleo en el Río de la Plata, contaminación por plomo en suelos y fugas de tanques de hidrocarburos en estaciones de servicio.

En USA, el servicio de protección ambiental (EPA) estima que los tanques de gasolina pierden unos 40 millones de

litros por año, además de salir al mercado unos 1.000 productos químicos nuevos al año. Dado estos volúmenes se comprende la necesidad de acción de verdaderas industrias para la depuración de suelos y aguas y la protección del ambiente

Para lograr una efectiva biodegradación es necesaria la presencia de microorganismos o de asociaciones apropiadas de ellos y de condiciones ambientales adecuadas para la actividad biológica. Se requieren además, conocimientos de ecología microbiana y de bioingeniería a los efectos de diseñar condiciones favorables para el desarrollo y actividad microbiana para descontaminar ambientes naturales.

Los procesos se realizan:

- ***in situ*****,** el suelo se emplea como un gran reactor, los residuos se incorporan en camadas de aproximadamente 50 cm, en el suelo o en pilas en el compostaje, donde sufrirán el ataque microbiano, se agregan los nutrientes necesarios y se ajusta la humedad para estimular a la biomasa microbiana

- **en reactores,** especialmente diseñados, que pueden tratar gran volumen de sustancias en períodos más cortos de tiempo.

Muchas veces resulta necesario incrementar la población de microorganismos responsables de las transformaciones. Así, la **inoculación** del ambiente contaminado con organismos seleccionados es una práctica muy empleada en la actualidad.

El incremento de los microorganismos activos se puede lograr de varias maneras:

- estimulación de la población existente por alteraciones del ambiente o agregado de nutrientes

- aislamiento y selección de organismos competentes y posterior inoculación

- uso de microorganismos construidos por ingeniería genética, con propiedades deseables que pueden albergarse en plásmidos o en el cromosoma microbiano.

Los cuadros 1 y 2 resumen los conceptos fundamentales en este tema.

Cuadro 1- Conceptos en la biorremediación

Biorremediación: Empleo de microorganismos, plantas o enzimas para la depuración de polucionantes en distintos ambientes

Biodegradación: Transformación parcial de polucionantes por agentes biológicos como los microorganismos

Mineralización: Conversión completa de un contaminante orgánico a formas inorgánicas

Cuadro 2- Requisitos para lograr éxito en la biorremediación

- Los contaminantes deben estar biodisponibles, es decir no adsorbido en un residuo inaccesible (arcillas, humus)
- Los microorganismos degradadores apropiados deben estar presentes en el suelo, agua, o disponibles para la inoculación
- Los compuestos recalcitrantes: no son degradados a velocidad razonable: ejemplo de compuestos naturales recalcitrantes: humus, artificiales (pesticidas, plásticos)
- Los organismos deben degradar el contaminante a velocidad tal que permita llevar su concentración a estandares regulares
- Deben reunirse condiciones ambientales favorables para el desarrollo microbiano: temperatura del suelo, pH, aireación, humedad
- Puede requerirse fertilización (N, P, K, etc.) para estimular procesos degradativos
- El costo del tratamiento debe ser menor que el de las otras tecnologías disponibles

La falla en alguna de estas condiciones puede conducir al fracaso de un proceso de biorremediación, como ocurre en caso de suelos muy secos, o de pH inadecuado para la actividad biológica.

El cuadro 3 resume las estrategias en la bioremediación.

Cuadro 3- Estategias para la biorremediación

- **Pasiva o intrínsica**: "natural", de un lugar contaminado por organismos indígenas.
- **Bioestimulación**: adición de nutrientes, N, P, S, etc. para incrementar a los microorganismos del suelo
- **Bioventilación**: donde se agregan estimulantes gaseosos al suelo, como O_2, CH_4, pasivamente o en forma forzada, para estimular la actividad microbiana
- **Bioaumentación**: inoculación de microorganismos a un sitio contaminado. El inoculante puede tener un microorganismo natural o modificado genéticamente (solos o en consorcio), seleccionados por su capacidad degradativa
- **Rellenos sanitarios**: *"landfarming"* enterrar contaminantes en suelos no contaminados, con capa impermeable inferior para evitar pérdidas. Se combina con los anteriores.
- **Compostaje:** microorganismos aerobios, termófilos, en pilas o reactores, humedecidos. Luego de atacar materiales rápidamente degradables, atacan a las sustancias xenobióticas
- **Fitorremediación:** empleo de plantas para sacar o transformar contaminantes (plantas hiperacumuladoras o que estimulan microorganismos rizosféricos degradadores)

La biorremediación **pasiva o intrínseca** es la que ocurre naturalmente por acción de los microorganismos nativos. Esta es la más frecuente estrategia de degradación de contaminantes, a pesar de que el proceso puede ser muy lento si las condiciones no son las adecuadas.

La **biestimulación,** que incorpora nutrientes, como fuentes de nitrógeno y fósforo, con el objeto de estimular a la microflora nativa, es corrientemente empleada. Los nutrientes pueden incorporarse con agua de riego, en caso de suelos contaminados, o en preparados solubles en hidrocarburos, en el caso de derrames de petróleo en el mar.

La **bioventilación,** que emplea gases estimulantes, como O_2, CH_4, en forma pasiva o forzada en los suelos a los efectos de incrementar la actividad degradadora de la población nativa, requiere dispositivos especiales, de tipo industrial, por lo cual los suelos contaminados se transportan y depositan en estructuras del tipo de los biodigestores, con las instalaciones adecuadas para la entrada pasiva o forzada de gases.

La **bioaumentación,** es la inoculación del sitio contaminado con microorganismos seleccionados para estimular la degradación. Los inoculantes pueden estar formados por microorganismos nativos seleccionados para el proceso en cuestión o bien se pueden usar aquellos genéticamente modificados, a los cuales por ingeniería genética se les incorporaron genes activos en la biodegradación. Puede tratarse de una sola especie o de varias especies (consorcio microbiano).

Los mismos se seleccionan en el laboratorio, inoculando con suelo o aguas, medios de cultivo con dosis crecientes de la sustancia tóxica en estudio, por ejemplo, hidrocarburos, como única fuente de C y energía. Las colonias que se desarrollan en estos medios, se van seleccionando por su capacidad degradadora sobre el xenobiótico.

Rellenos sanitarios, consisten en la aplicación e incorporación de suelos contaminados en la superficie de suelos no contaminados. Son en general excavaciones de suelos muy pobres, con un fondo de arcillas o algún material impermeable, para evitar la contaminación de las napas freáticas. El suelo contaminado es arado y se mezcla bien, pudiéndose incorporar nutrientes, inóculo microbiano y gases, para acelerar el proceso.

Compostaje, es el uso de procesos microbianos aerobios y termófilos en pilas o reactores, para degradar el polucionante. Los dispositivos se mezclan periódicamente y se humedecen a los efectos de lograr la máxima actividad biológica. Los microorganismos activos se encuentran en el suelo y son incrementados por el proceso de compostaje.

Fitorremediación, es el empleo de vegetales para absorber, remover o transformar contaminantes. Son muy empleadas en el caso de remoción de metales pesados, que se acumulan en la madera en el caso de árboles o en la fitomasa en herbácea, que debe tratarse luego en incineradores.

La acción se da directamente, en plantas hiperacumulantes, o indirectamente, por estimulación de microorganismos activos en su rizosfera.

Como vimos en el capítulo anterior, en la degradación de una molécula recalcitrante es necesario tener en cuenta sus características (peso molecular, solubilidad en agua y en otros solventes, sustituyentes halogenados, etc.) y las condiciones del ambiente.

En el cuadro 4 se resumen condiciones del ambiente a tener en cuenta en el proceso.

Si bien las sustancias de origen biológico naturales, son degradadas por algún tipo de microorganismo en ambientes como el suelo, las aguas y también lo hacen muchas de las de origen sintético, existen sustancias de lenta degradación, llamadas **recalcitrantes.** Entre las naturales se encuentra el humus, de lenta degradación y entre las que sintetiza el hombre, encontramos muchos pesticidas, solventes, derivados clorados.

El suelo y las aguas constituyen importantes reservorios de microorganismos con variadas actividades degradadoras y mineralizantes. Estos microorganismos cuando están provistos de fuentes adecuadas de C, N y energía y al encontrar condiciones ambientales adecuadas para su desarrollo, constituyen importantes agentes para la biorremediación de sitios polucionados. Los procesos de degradación ocurren, como vimos, en variadas condiciones, tanto aerobias como anaerobias.

Los principales intentos de biorremediación ocurren en aerobiosis, aunque se incrementan los tratamientos que emplean anaerobiosis.

La degradación se realiza en general por un consorcio de microorganismos, cuyos genes muchas veces contenidos en plásmidos, codifican para la degradación en sucesivos pasos, hasta llegar a la mineralización. Muchas veces, un solo paso metabólico, puede llegar a liberar un producto orgánico no tóxico, sin llegar a los compuestos minerales.

Sus enzimas pueden ser intra o extracelulares y la función que cumplen los xenobióticos en la biorremediación es generar energía y/o obtener fuentes de C, N y otros nutrientes para su desarrollo.

Muchos microorganismos son hiperacumuladores de sustancias tóxicas, como lo son muchos metales pesados. Algunos hongos pueden acumular más de 2g/kg de arsénico en sus cuerpos fructíferos, un nivel suficientemente alto como para convertirlo en tóxico si se consume.

Cuadro 4- Condiciones del ambiente a tener en cuenta en la bioremediación

- Contenido de humedad, regulada usualmente por irrigación o por aerosoles
- Niveles de oxígeno, mezclando el suelo con arados y/o aireación
- Nutrientes, primariamente carbono, nitrógeno y fósforo, agregados por fertilización
- pH, en caso de acidez ,se puede incrementar ligeramente por encalado
- Estructura del suelo, se favorece por agregado de aditivos (pajas, arcillas) o por mezclado con arados o aireación
- Temperatura: muchos preparados se agregan en forma de aerosoles a mayor temperatura que la ambiente

Se resumen a continuación algunos de los múltiples casos de biorremediación señalados en la bibliografía (Eccles, 2003), que por otra parte es muy numerosa en la actualidad. El tratamiento es en general realizado por empresas dedicadas a la conservación del ambiente.

Cualquiera sea la estrategia abordada, tendrán mayor interés aquellas en las cuales se obtiene un producto valorizado, que se pueda recuperar y redunde en ingresos económicos, como es el caso de realizar compostaje o fitorremediación.

Los tratamientos, además, deberán competir en eficiencia, rapidez, seguridad y costos, con los procedimientos físicos (empleo de solventes, extracción mecánica, etc.) y químicos (ácidos, álcalis), empleados también en la actualidad.

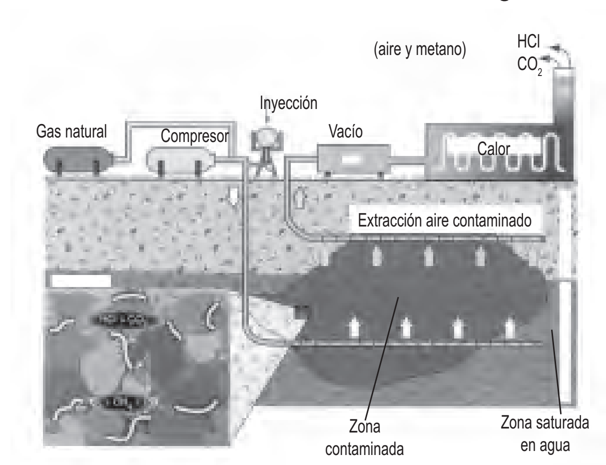


Figura 1- Ejemplo de tratamientos de suelo contaminado, por bacterias metanotróficas.

Ejemplos de biorremediación

- USA: decontaminación de suelos con TCE (tricloroetileno) y PCE (tetracloroetileno) por inyección de aire en tubos horizontales con 1% CH_4. Aumenta el Nº de metanotróficos que promueven zonas anaeróbicas donde se reducen los contaminantes: (para reducir 95% de contaminación se requirieron 10 años sin CH_4 y menos de 4 años con él, con ahorro de 1,5 millones de dólares)

- California, USA: derrame de 4.000 L de diesel (45% alcanos cíclicos, 30% normales y 24% aromáticos). En 6 meses, la contaminación bajó a menos de 10-1.500 mg HC/kg suelo. Microorganismos degradadores nativos + nutrientes (N, S) y H_2O_2 se mezclaron con agua y se inyectaron cada 2 semanas por 4 meses

- Lousiana, USA: derrame de 10.000 m^3 atrazina en área de 8 ha. Se efectuó relleno sanitario arando 4 veces/semana. Se agregaron 880kg fert/ha (N,P,K 13-13-13)+ 2.000 L de inoculante de un consorcio de microorganismos degradadores (en 20 semanas, la atrazina bajo de 100 mg/kg a menos de 10 mg/kg, con variaciones en las unidades por mezclado incompleto)

- En el subsuelo: Problemas especiales por permeabilidad limitada (agua, O_2): Pozos de inyección y control: nutrientes y fuente de O_2 (aire comprimido y peróxido) y/o con eliminación física de vapores mediante vacío. Meses o años en completarse (figura 1) (Skipper, 1998)

- Casos especiales: inoculación

- Recuperación de metales a partir de minerales con niveles muy bajos de los mismos, no aptos para fundición. Se emplea *Thiobacillus ferrooxidans* y otros microorganismos, cuya gran producción de ácido permite extraer un 70% del hierro (biolixiviación)

CuSO4 + Feº——— Cuº + FeSO4

soluble (3g/L) precipita y se recoge en fosa de sedimentación

- **Caso del Exxon Valdez:** en marzo de 1989 se derramaron 40 millones de litros de petróleo puro en Prince William, Alaska. Cerca de 1.600 Km de costa se afectaron y la limpieza total costó 1.500 millones de dólares. Constituye un caso muy conocido por el impacto causado en el ambiente, superado lamentablemente por el ocurrido en Galicia, España, en el 2003.

Dada la extensión del área, la limpieza debió involucrar microorganismos nativos.

La degradación fue estimulada por una microemulsión de nutrientes con NPK. Luego de ensayar varios fertilizantes, se seleccionó una emulsión, **Inipol EAP22**, un fertilizante oligofílico, formulado en base a agua/aceite que rinde 7,3/0,8/0 NPK. La fuente de N es la urea y el P, el fosfato.

Se calienta a 90ºC antes de aplicarse en *spray* en las costas (300mL/m^2). Cuando la emulsión se mezcla con el petróleo crudo, se desestabiliza y se liberan los nutrientes. Además, un material orgánico tensoactivo, el ácido oleico, sirve de fuente de carbono y de energía de modo que se logra el incremento de la población nativa de degradadores de hidrocarburos, los que una vez agotadas las reservas del Inipol, atacan las moléculas de petróleo.

Ocurrió significativa biorremediación en 2 semanas, con una eclosión de microorganismos degradadores de hidrocarburos (1000X).

El proceso ocurre también en condiciones naturales, pero a una velocidad mucho menor.

Este suceso demostró las ventajas de estas técnicas de biorremediación ya que ocurrió en condiciones muy frías de Alaska y se mostró más eficiente que los tratamientos previos físicos y químicos (solventes, envasado del petróleo).

En la figura 2 se aprecia un ensayo de degradación de derivados del petróleo estimulada por el agregado de fertilizantes. Mientras 80% de los hidrocarburos no volátiles se degradaron entre 6 meses a 1 año, las cadenas laterales y los hidrocarburos aromáticos llevaron más tiempo.

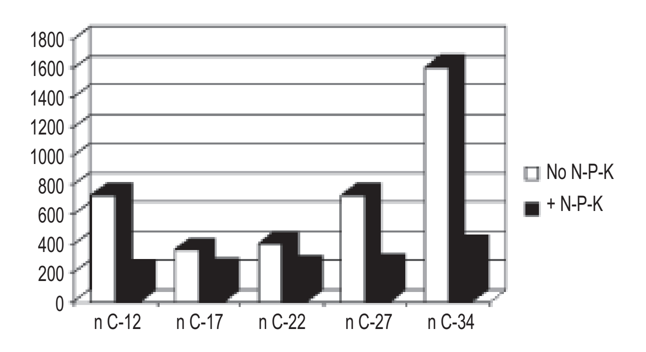


Figura 2- Efecto de la fertilización en la degradación de n-alcanos en playas con petróleo

El cuadro 5 resume aspectos de la biodegradación de hidrocarburos derivados del petróleo.

Cuadro 5- Degradación de derivados del petróleo

- No son aptos para fermentar, se degradan en presencia de O_2 y en condiciones adecuadas de temperatura, H%, nutrientes
- Variedad de bacterias, ciertos hongos y levaduras y cianobacterias pueden oxidar HC: colonizan las gotas oleosas en superficie
- Los hidrocarburos volátiles llegan a la atmósfera y quedan en el suelo los de largas cadenas alifáticas y aromáticas
- Bacterias oxidantes aumentan 10^3 a 10^6 de veces en corto tiempo luego del derrame
- Condiciones ideales y con HC marcados y medida de consumo de O_2 mostró que más del 80% de los no volátiles son oxidados por bacterias en el 1er año del derrame. Los de cadena ramificada y los policíclicos, requieren más tiempo
- Los que llegan a los sedimentos, son más difíciles de eliminar

El cuadro 6 resume el efecto del ambiente y características de los microorgnamismos en la degradación de hidrocarburos

Cuadro 6- Requisitos para la biorremediación de hidrocarburos: interacciones de los factores microbianos y del ambiente

Componente del sistema	requisito
microorganismo	capacidad de degradar el HC, para contribuir a la bioemulsificación capacidad de FBN
entorno	nutrientes accesorios (N,P,K,Fe) disponibles en la misma ubicación física que los microorganismos y el hidrocarburo ausencia de metales pesados, que puedan dañarlos temperatura, pH en el rango adecuado, etc.

El cuadro 7 esquematiza los tratamientos antipolucionantes en aguas

Cuadro 7- Biorremediación en ambientes marinos

- Pastillas con nutrientes y preparación oleofílica (soluble en HC) (reducción 30-40% de manchas en relación a controles sin adiciones)
- Vapor a alta presión, altera la comunidad microbiana
- Inoculación con microorganismos:
  - * aislados en zonas de campo contaminadas
  - * obtenidos de colecciones de cultivo seleccionadas de la naturaleza
  - * mejorados genéticamente: *Pseudomonas* con plásmidos que degradan HC, fue patentada en 1974.

Pueden no resultar eficaces por diversas causas, entre ellas:

i) predación por protozoos
ii) no establecer contacto con el sustrato a degradar
iii) no han logrado competir con la flora indígena y sobrevivir

Biorremadiación natural

Intervienen procesos físicos, químicos y biológicos no controlados. Se han logrado importantes resultados: los microorganismos se adaptan a los hidrocarburos y desarrollan vías de degradación.

Ej. una gran acumulación de productos bifenilpoliclorados (BPC) ocurrió en el río Hudson (NY) y los microorganismos nativos fueron capaces de deshalogenarlos en anaerobiosis. Luego los barros se airean para lograr una degradación completa.

Microflora activa: un hongo el *Phanerochaete chrysosporium* es un hongo basidiomicete capaz de degradar i) la madera (podredumbre blanca) y ii) muchas sustancias xenobióticas como benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos, clorados como 2,4,5 triCl etileno (TCE) y triclorofenoles. Estos últimos son contaminantes de conservantes de la madera y se usan también como pesticidas.

Los productos son degradados actuando como nutrientes (fuentes de energía, carbono) en la fase lograrítmica de crecimiento o por cometabolismo: donde la sustancia es degradada luego del crecimiento activo.

Los procesos ocurren:

i) **en la naturaleza**, caso de derrames, causes contaminados con derivados de petróleo, pesticidas, etc.

ii) en **biorreactores**: aparatos diseñados por la industria que contienen en general una fase sólida con los microorganismos activos adsorbidos a la misma o bien con enzimas como la lignina peroxidasa, piranosa oxidasa, activas en la degradación de la madera, actuando al estado adsorbido.

Control de la biodegradación

Existe una gran fuente de contaminación por el desarrollo de microorganismos en el fondo de tanques que actúan como depósitos de combustibles (estaciones de servicio, combustibles para aviones, etc.)

Se requiere una limpieza a fondo de los filtros y eliminando el *biofilm* que se forma contra las paredes y que resulta difícil de eliminar por las técnicas usuales de limpieza. Se desarrolla un hongo, llamado hongo del queroseno, *Cladosporium resinae* a expensas de esos residuos firmemente adheridos.

La degradación de maderas blandas almacenadas para la fabricación de papel ocasiona pérdidas importantes. Los productos de desecho se lavan, pero los micoorganismos se desarrollan y alteran las propiedades de los materiales.

Se aplican **biocidas**: antes se usaban derivados de Hg, pero actualmente se los considera muy tóxicos y contaminan los ríos. Para evitar los *biofilms* se usa cloro, fenoles, organosulfurados, lavado con álcali caliente. Otros productos de la industria pueden ser atacados por microorganismos degradadores alterando la materia prima, como los textiles, cueros, metales, pinturas, hormigón.

Fitorremediación

Algunas plantas exhiben una tolerancia excepcionalmente alta a elementos minerales y son capaces de acumularlos en sus tejidos. Estas plantas acumuladoras son en general indígenas en un suelo particular o roca madre y se emplean para depuración de suelos contaminados.

Una estrategia muy utilizada en la actualidad, consistente en recrear en el sitio contaminado una comunidad planta/ microorganismos capaces de tolerar el polucionante y participar en su eliminación (cuadro 8, figura 3). Se asegura la degradación de polucionantes orgánicas por plantas o microorganismos asociados (hongos micorrícicos, metanotróficos, bacterias rizosféricas). También se están desarrollando técnicas genéticas para producir plantas con la capacidad de degradar atrazina y otros pesticidas. Las plantas extraen los contaminantes, se cosechan y procesan en forma controlada (reciclaje).

Cuadro 8- Mecanismos de fitorremediación

i) indirectamente, estimulando la actividad microbiana en la rizosfera

ii) directamente: absorbiendo el polucionante e inmobilizándolo (en maderas, en caso de árboles) o degradándolo en sus tejidos

Se usan: plantas herbáceas (flotadoras, de crecimiento rápido, como los camalotes)

árboles: especies fijadoras de N_2: *Alnus glutinosa, Casuarina* (resisten altos niveles de Cu, Cd, Zn. Pb

i) los costos de instalación y mantención deben ser menores que en otros tratamientos

ii) la biomasa puede ser utilizable por el ganado (leguminosas herbáceas) o enterrada (abono verde)

iii) en el caso de los árboles, la madera no entra en la cadena alimentaria humana (muebles, papel)

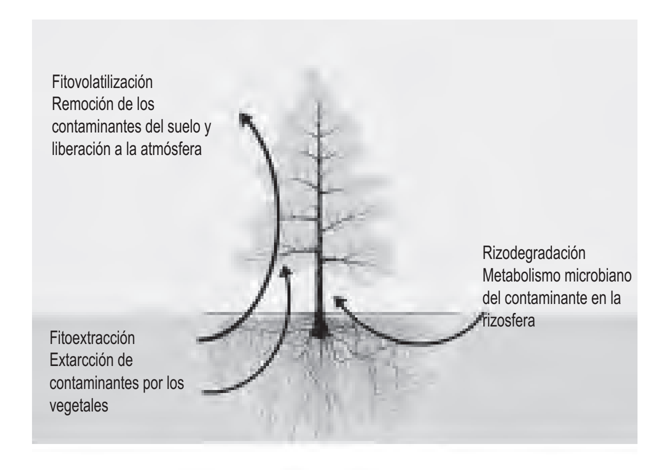


Figura 3- Procesos involucrados en la fotorremediación

Arboles en fitorremediación

A estas especies se les requiere:

i) que produzcan una biomasa radical muy desarrollada capaz de estimular la actividad microbiana rizosférica

ii) que presenten genes que secuestren metales pesados o degraden sustancias indeseables (fenoles halogenados)

Ejemplos de árboles usados en la depuración de aguas y atmósfera

Son seleccionados árboles fijadores de nitrógeno (AFN) por su rápido crecimiento y adaptación a ambientes pobres.

Especies de *Casuarina* pueden filtrar el aire y retener polvos industriales (radioactivos) y reducen el efecto invernadero. Ejemplo *Casuarina glauca y C. cunninghamiana* son usadas en suelos salinos o sódicos en California y se informa que reducen el volumen de aguas salinas de drenaje y con nitratos. Limitan la eutroficación de las aguas con nitratos, sulfatos.

Eliminan la polución por nitratos, mediante la absorción radical y activando la desnitrificación, con microorganismos estimulados en la rizosfera que emplean sustratos carbonados a partir del mantillo.

Otras especies fijadoras de nitrógeno son empleadas en tratamiento de aguas servidas en el Cairo: *Acacia saligna A. nilotica, Erythrina indica*, asociadas a especies no fijadores como *Populus, Salix*, etc.

Otros ejemplos incluyen (cuadro 9):

Cuadro 9- Ejemplos de fitoacumulación

1- Alfalfa que hiperacumula N, absorbe gran cantidad de nitratos
2- *Sebertia* sp acumula hasta 25% de Ni
3- *Thlaspi* sp acumula más de 4% de Zn
4- Tierras inundadas con vegetales que remueven uranio y selenio

Problemas

La hiperacumulación es a veces específica para un solo elemento
La mayoría de las plantas crecen lentamente y con bajo rendimiento
Procesamiento: es necesario colectar la fitomasa y recu perar los contaminantes
Pueden estar asociadas a enfermedades poco estudiadas

i) empleo de híbridos de álamos en zona talada para convertirla a la agricultura, redujeron los nitratos un aguas subterráneas de 50-100 a 5 mgL^{-1}, y eliminaron el 20% de la atrazina

ii) palmeras plantadas en suelos marginales con 5000ppm TNT redujeron el TNT en la solución del suelo de 128 a 10ppm en una semana

El cuadro 10 resume algunas consideraciones en la aplicación de esta técnica de biorremediación.

Cuadro 10- Condiciones del éxito de la fitorremediación con árboles

- elección cuidadosa de las especies de AFN mejor adaptados a las condiciones a rehabilitar: con crecimiento rápido (2m/año en altura)
- inoculación con: bacterias simbióticas, hongos micorrícicos, microorganismos promotores del crecimiento vegetal y componentes de la microfauna
- aplicación de técnicas de acompañamiento: abonos, dosis mínimas de fertilizantes (P), sin olvidar la irrigación
- estudiar el efecto de la irrigación y de los polucionantes de las aguas en la FBN
- cuidar de no polucionar las napas freáticas si la irrigación no se controla
- no se sabe aun si el carácter de FBN mejora o no la adaptabilidad y el rol depurador de la vegetación leñosa

En el caso de la absorción directa, las moléculas pequeñas, de bajo peso molecular son favorecidas en relación a las de mayor peso molecular ya que las últimas, sobretodo si son lipofílicas, tienden a ser excluidas de la zona radical.

En resumen: Se analizaron procedimientos biológicos para lograr restaurar suelos y aguas contaminados, la mayoría de las veces por actividades del hombre, que es necesario llevar a un estado "saludable". Los abordajes incluyen remediación pasiva o activa, con aditivos de fertilizantes, control de la humedad y temperatura, incorporación de gases a presión (O_2, CH_4), oxidantes (H_2O_2), compostaje, rellenos sanitarios y fitorremediación.

La literatura abunda en situaciones particulares con abordajes realizados en general, por empresas dedicadas a esta tarea. Alguno de estos casos sirvió como ejemplo de biorremediación.

La biorremediación es en general, menos riesgosa para el personal que la aplica y menos costosa que los otros procedimientos ya que los contaminantes pueden tratarse en el lugar. Por su naturaleza biológica ejerce impacto menor en el ambiente ya que no genera residuos.

No pueden dejarse de señalar desventajas del procedimiento, relacionadas a: el contaminante puede presentarse con baja biodisponibilidad, pueden darse sitios con una mezcla de contaminantes orgánicos e inorgánicos.

En estos casos puede darse la situación de que un compuesto pueda degradarse, mientras que otro sea tóxico para los microorganismos o que las condiciones ambientales para los distintos contaminantes pueden ser muy diversos: aerobiosis/anaerobiosis, distintos pH, sequedad.

Se requieren aún mayores estudios para manejar las interacciones biológicas, físicas y químicas en ambientes con mezcla compleja de contaminantes.

Bibliografía

Alexander, M. **Biodegradation and bioremediation.** 1994 Academic Press, San Diego, California, USA

Baker, K. H. and Herson, D.S. **Bioremediation,** 1994, McGraw-Hill, New York

Balba, M. T. Microorganisms and detoxification of industrial waste. En: **Exploitation of Microorganisms**, 1993 D. G. Jones (ed), Chapman & Hall, London: 371-410

Barkay, T., D. F. Schearer y B. H. Olson **Toxicity Testing Using Microorganisms,** 1986, B. J. Dutka y G. Bitton (eds) vol 2, CRC Press, Boca Raton, Florida: 133-135

Bouwer, E. J. Bioremediation of organic contaminants in the subsurface. En: **Environmental Microbiology**, 1993, Wiley-Liss, New York: 287-318

Cunningham, S. D. Y Lee, C.R. Phytoremediation: Plant-based remediation of contaminated soils and sediments. En: **Bioremediation: Science and Applications.** 1995, Skipper y Turco (eds) Soil Science Society or America. Special Publication Nº 43, Madison, Wis.

Eccles, H. **Bioremediation** 2003, British Nuclear Fuels, preston, UK, 352 pp.

Hickey, W. J. Biochemistry and Metabolism of Xenobiotic Chemicals. En: **Principles and Applications of Soil Microbiology**. 1998 Sylvia, Fuhrmann, Hartel y Zuberer (eds), Prentice Hall, N. Jersey: 447-468

Shannon, M. J. R. y R. Unterman Evaluating bioremediation: Distinguishing fact from fiction. 1993 Ann. Rev. Microbiology, Palo Alto, 47, pp: 715-738

Siqueira, J. O., F. M. de S. Moreira, B. M. Grisi, M. Hungria y R. S. Araujo **Microorganisms e Processos Biológicos do Solo: Perspectiva Ambiental,** 1994, EMBRAPA-SPI, Brasilia, DF

Skipper, H. D. Bioremediation of Contamined Soils. En: **Principles and Applications of Soil Microbiology.** 1998, Sylvia, Fuhrmann, Hartel y Zuberer (eds), Prentice Hall, N. Jersey: 469-481

Preguntas de repaso

1) Defina el término biorremediación
2) ¿En qué situaciones estos procedimientos son de aplicación ventajosa en relación a otros posibles?
3) Concepto de los términos: bioaumentación y bioestimulación. Ejemplos de sus aplicaciones
4) Analice el caso de inoculación con microorganismos seleccionados
5) Explique brevemente estrategias para obtener estos microorganismos disponibles para la inoculación de grandes áreas contaminadas
6) Empleo de vegetales en la biorremediación. Mecanismos involucrados
7) Discuta los procesos de degradación de un polucionante por metabolismo normal y por cometabolismo.
8) ¿Por qué conviene seleccionar vegetales (árboles y/o herbáceas) fijadoras de nitrógeno en la depuración de ambientes contaminados?
9) ¿Cuál es el destino de metales pesados en caso de la fitorremediación por árboles?

Anexo práctico

Muestreo y análisis físico-químicos

Muestreo de suelos, aguas, alimentos, conservación de las muestras, humedad:

H% y factor de corrección de la humedad (h)

Análisis físicos y químicos: pH, C-orgánico, N-organico, $N\text{-}NH_4^+$, $N\text{-}NO_3^-$

Prácticas usuales en el Laboratorio de Microbiología

Bioseguridad, microscopía, tinciones, siembra y aislamiento

Indicadores biológicos en estudios de ecología microbiana

Actividad respiratoria: desprendimiento de CO_2

Biomasa microbiana: C de la biomasa por técnicas de fumigación-inoculación y fumigación-extracción. N-biomasa, P-biomasa

Indices: Coeficiente de mineralización del C-orgánico= ($C\text{-}CO_2$/C total) x 100

Biomasa como %C total= (C-biomasa/C total) x 100
Coeficiente respiratorio= $qC\text{-}CO_2$/C-biomasa

Actividades enzimáticas: deshidrogenasas, fosfatasas ácida y alcalina, hidólisis del acetato de fluoresceína (*FDA*)

Diversidad estructural y funcional de comunidades microbianas del suelo:

Perfil fisiológico de la comunidad, análisis de moléculas específicas: ácidos grasos, ácidos nucleicos

Recuentos microbianos: heterótrofos totales, hongos, algas, protozoos, grupos fisiológicos

Ciclos biogeoquímicos e interacciones con plantas

Carbono: actividad mineralizante, amilolíticos, celulolíticos

Nitrógeno: Fijación biológica del N_2 (FBN), mineralización: amonificación, nitrificación. Pérdidas: desnitrificación

Azufre: sulfooxidación, sulfatorreducción

Fósforo: solubilización de P insoluble. Mineralización de P-orgánico

Micorrizas: ecto y endomicorrizas del tipo arbuscular. Inoculación

Biodegradación de residuos

Evaluación del grado de madurez de *compost*

Bibliografía

Muestreo y acondicionamiento de las muestras de suelo

a) un número adecuado de submuestras (10-20) compone la muestra de suelo, por ejemplo, 1 Kg, recogidas en el predio al azar

b) secar las muestras al aire, sobre papel absorbente en bandejas dentro del laboratorio o usarlas inmediatamente (estado fresco)

c) tamizar el suelo a 2mm y guardarlo en bolsas de plástico bien cerradas y rotuladas en heladera (3-5ºC) hasta efectuar los análisis (no más de 15 días-1 mes). Según las determinaciones a efectuar, muchas muestras pueden guardarse congeladas a –20ºC hasta su empleo y a otras se las analiza al estado fresco, como vienen del campo.

Determinación del porcentaje de humedad

Se realiza en cápsulas metálicas con tapa, numeradas y pesadas previamente = Peso Tara (PT). En caso de no disponer de las mismas, usar cajas de Petri

Procedimiento

a) Colocar suelo fresco en las cajas, pesar las mismas (una cifra después de la coma) = Peso Fresco (PF)

b) Colocar las muestras en estufa a 105°C durante 48 horas, destapadas (conservar los rótulos)

c) Poner las cajas tapadas en desecador con silica-gel deshidratado o $CaCl_2$ anhidro hasta pesar

d) Pesar nuevamente = Peso Seco (PS)

Cálculo del H% (agua como % del peso seco del suelo)

$$H\% = \frac{PF - PS}{PS - PT} \times 100$$

Cálculo del factor de corrección de la humedad:

$$h = \frac{100 + H\%}{100}$$

NOTA: al multiplicar los datos por **h**, éstos se expresan por suelo seco

Análisis físicos y quimicos

(Bremner, 1965; Nelson y Sommers, 1982¸ Robertson *et al.*, 1999)

pH

Mezclar 1 parte de suelo con 2,5 partes de agua. Agitar y medir en pHmetro. Se suele medir también en solución de KCl

C-orgánico

El C-orgánico del suelo es oxidado por tratamiento con dicromato de potasio y ácido sulfúrico concentrado en caliente. El Cr^{+3} liberado se determina colorométricamente y se asume que es proporcional a la materia orgánica del suelo

- Pesar 0,5-2g de suelo seco al aire en matraz de 100mL, agregar 20mL de solución de dicromato de potasio 0,33M (98,06g K2Cr207 en 1L agua, si es necesario calentar). Agregar cuidadosamente 15mL de ácido sulfúrico concentrado (96-98%) bajo campana. Reposar por 2-3 horas

- Diluir a 100mL con agua destilada y mezclar. Dejar toda la noche

- Determinación fotométrica: tomar 1 mL y diluir a 25mL con agua destilada, mezclar brevemente. Diluir soluciones estandares en la misma forma

- Medir las muestras a 570mn frente a blancos y calcular % C-orgánico a partir de la curva de calibración (ajuste a una recta): ejemplo: 3,75 g de glucosa en 1L agua, equivale a 1,5g de C/L o 1.500 mg/L= 1.500ppm. Diluir la misma 5 veces para obtener 0,3g/L y 20 veces para 0,075g/L.

- Determinar contenido de C de alícuotas de las soluciones estandares, por ejemplo entre 0 y 1mg/mL de solución por el mismo procedimiento que las muestras de suelo analizadas

Nota: Considerando que el contenido medio de carbono en la materia orgánica es de 58%, el C-orgánico se con-

vierte en contenido de materia orgánica empleando el factor 1,72

N-orgánico

En digestión con H_2SO_4 el N-orgánico se convierte en amonio. Se aumenta la temperatura de digestión con K_2SO_4 y el Cu y Se actúan como catalizadores que incrementan la velocidad de oxidación de la materia orgánica. El N-$NH4^+$ formado se puede determinar de varias maneras: colorimétricamente con reactivo de Nessler, con electrodos específicos o por destilación con álcali. En este caso el destilado se recoje en ácido bórico y se forma borato de amonio, que se valora con ácido clorhídrico. Los nitratos y nitritos no se incluyen en esta valoración, sino que se determinan como amonio luego de su reducción con amalgama Dewarda (Cu, Zn en polvo).

- 0,5-2g de suelo seco al aire se colocan en balones de Kjeldahl de 100mL (semi-micro análisis), se agrega 0,5g de mezcla catalítica (100g de K_2SO_4, 10g $CuSO_4.5H_20$, 1g de Se) y 20mL de ácido sulfúrico concentrado. Calentar en el equipo Kjeldahl a más de 400ºC hasta que la solución se aclara

- Enfriar a temperatura ambiente y llevar el volumen a 100mL en recipiente aforado

- Transferir una alícuota al balón de destilación. Colocar 10 mL de solución de ácido bórico al 10% en un erlenmeyer donde se recogerá el destilado y unas gotas de indicador, por ejemplo una mezcla de verde de bromocresol y rojo de metilo

- Agregar exceso de solución de NaOH (32%p/v) al balón de destilación y calentar por 3-20 minutos por arrastre de vapor hasta transferir todo el amonio (reacción neutra en el destilado, medida con papel pH)

- Valorar con ácido sulfúrico diluído (0,05M valorado) hasta viraje del indicador. Proceder igual con los blancos

$$\%N = \frac{S\text{-}C \times 14.\ 0{,}005\ N \times 100 x\ h\ .100}{\text{Alícuota}\ X\ \text{Peso suelo}}$$

S = gasto en la muestra
C= gasto en el blanco
14= equivalente en N
h= factor de corrección H%

N-NH_4^+, N-NO_2^- y N-NO_3^-

La amonificación y la nitrificación se evaluan por la producción de N-NH_4^+, N-NO_2^- y N-NO_3^- y su variación en el tiempo en el suelo mismo, solo o con distintos agregados: fertilizantes, pajas, pesticidas, etc.. Los ensayos pueden ser controlados en laboratorio *(in-vitro)* lo que evidencia **actividades potenciales** o en el campo (*in situ)*, donde se evalúan las **actividades reales**.

Es de destacar que estas medidas constituyen un dato puntual, una imagen como fotográfica de los que realmente ocurre ya que estos iones siguen numerosas vías en los ecosistemas terrestres o acuáticos (capítulo 10).

Las técnicas de evaluación de amonio, nitrito y nitrato son muy variadas: colorimétricos, electrodos específicos, por desplazamiento del amonio con una base fuerte (OMg) y titulación con ácido, reducción de nitritos y nitratos por metales reductores, desplazamiento del amonio formado y su valoración, como anteriormente (técnica semi-micro Kjeldahl)

N-NH_4^+

- Colocar 2 g suelo en balón de destilación de 100 ml, agregar 10 mL KCl 2N y 0,1 g de OMg

- Conectar el balón al aparato de destilación con arrastre de vapor, destilar y recoger en erlenmayer de 125 mL con 5 mL sol. al 2% de ácido bórico con mezcla indicadora de verde de bromocresol y rojo de metilo, destilar hasta unos 30 mL

- Valorar el amonio con $H_2\ SO_4$ 0,005N con microbureta o pipeta de 5 mL hasta desaparición de color verde y aparición de tono rosa

gasto= GM, igual procedimiento para blancos (gasto = GB)

N-NO_3^- (incluidos los nitritos)

- se procede como anteriormente, agregando al mismo balón en que se determinó el amonio y se enfrió en agua, 0,2 g de aleación Devarda (mezcla de metales reducto-

res). Se destila el amonio formado a partir de la reducción de nitritos y nitratos

Cálculos: mgN-min/kgsuelo seco=

$$\frac{14\ (GM-GB)\ 0{,}005\ N \times h\ \ X1000}{\text{peso de la muestra}}$$

Prácticas usuales en el laboratorio de Microbiología

(Guía de Clases Prácticas de Microbiología, Facultad de Agronomía, 2005: Curso Práctico de Microbiología General, Facultad de Química, 2000)

Normas básicas de seguridad en un laboratorio de Microbiología

- Deben cumplirse reglas de estricta higiene en el laboratorio, el que debe mantenerse limpio y ordenado

- Minimizar el material sobre las mesadas, las que se desinfectan con alcohol al comienzo y al final de la tarea

- Trabajar e cámara de flujo laminar o en su defecto, en zona protegida por mecheros, sin corrientes de aire

- Al usar cámaras de flujo laminar, controlar su esterilidad periódicamente, encender la lámpara de luz ultravioleta 10-15´ antes de la tarea, con las puertas cerradas, dejarla en óptimas condiciones de limpieza al finalizar

- Todos los accidentes o derrame de materiales deben comunicarse al docente y todo material contaminado debe llevarse a la sala de limpieza en recipientes con alcohol (pipetas, varillas, bisturís, portaobjetos). No depositarlos sobre la mesada de trabajo.

- Usar túnica y lavarse las manos al finalizar la tarea y cada vez que se sospeche contacto con material contaminado

- No pipetear con la boca, emplear peras de goma y/o pipetas especiales

- No fumar, llevar alimentos o beber en el laboratorio

Microscopía

- Colocar la preparación

- Abrir el diafragma de la fuente de luz y el del condensador al máximo

- Colocar el objetivo de menor aumento: x10

- Encender la fuente de luz, ajustar los binoculares a la distancia interpupilar

- Enfocar la preparación, cerrando el diafragma de la fuente luminosa hasta visualizar una imagen poligonal

- Bajar el condensador hasta distinguir nítidos los contornos del polígono, si la imagen no está en el centro, centrarla y ajustar el enfoque

- Abrir el diafragma hasta que el polígono apenas salga del campo. No tocarlo más

- Elegir el contraste óptimo ajustando el diafragma del condensador

- Verificar la iluminación sacando los oculares y observando por el tubo hacia los objetivos, ajustar el difragma a 2/3 abierto (2/3 de campo iluminado)

- Al cambiar e objetivo modificar el diafragma de la fuente de luz y el del condensador a la apertura del objetivo

Cada vez que se usa: limpiar el aceite de inmersión de las lentes con un algodón seco, apagar la fuente de luz y cubir el microscopio con su funda.

Los microscopios y lupas deben limpiarse regularmente, en forma profunda, tarea realizada por técnicos especializados.

Observación de los microorganismos Tinciones

Manipulación aséptica de los cultivos

Las técnicas en Microbiología requieren de un trabajo aséptico, evitando contaminaciones del exterior a la mues

tra en estudio. Trabajar en cámara de flujo laminar o entre dos mecheros encendidos.

Toma de muestras para observaciones microscópicas o para siembra

- tomar el tubo de ensayo con la mano izquierda, de modo que su base toque la palma de la mano y aflojar el tapón

- tomar el ansa con la mano derecha, con los dedos pulgar, índice y mayor dejando libres el anular y meñique a los efectos de poder asir el tapón

- quemar el ansa introduciendo la punta en el cono frío de la llama del mechero en posición vertical y luego ir levantándola hasta que quede toda al rojo, pasarla por la llama en un ángulo de 60º con la vertical, manteniéndola siempre en posición paralela al cuerpo.

- flambear el metal adyacente

- cerca del mechero, tomar el tapón de algodón o de plástico del tubo con los dedos anular y meñique de la mano derecha y quitarlo girando el tubo, flambear la boca del tubo

- introducir el ansa tocando la pared fría dentro del tubo (sin soltar el tapón) para que el ansa se enfríe y luego introducirla en el cultivo líquido o deslizarla sobre la superficie de un cultivo sólido de abajo hacia arriba, para tomar el cultivo a transferir (inóculo)

- sacar el ansa cargada del tubo, flambear la boca y taparlo

- transferir el inóculo a un portaobjeto o a otro medio de cultivo (siembra)

- quemar nuevamente el ansa

Algas, hongos y protozoos

Dado su mayor tamaño en relación a las bacterias, su observación se realiza en general, al estado fresco, sin fijar ni teñir, colocando las muestras entre porta y cubreobjeto o en portaobjetos excavados que permiten observar una gota de líquido suspendida.

Las estructuras de los **hongos** se aprecian muy bien tocando las colonias suavemente con una cinta adhesiva, la que luego se pega sobre un portaobjeto, de esta manera se evita la rotura del micelio que ocurre con el uso de ansas, puntas, etc. También se aprecian colocando la caja de Petri sobre la platina del microscopio y tratando de enfocar a bajo aumento, regulando la luz a niveles adecuados.

Bacterias

- al estado fresco, sin teñir

- células fijadas, teñidas con colorantes

Las bacterias vivas son difíciles de observar sin teñir ya que su índice de refracción es muy similar al del agua, no se aprecia contraste con el medio que las rodea. Una propiedad importante se aprecia al estado fresco es **la movilidad**

- se coloca la preparación (cultivo jóven de bacterias en medio líquido) entre porta y cubreobjeto o en portaobjetos excavados y se observa en el microscopio óptico a x40 con mínima iluminación o en microscopio de contraste de fases. Debe distinguirse el movimiento flagelar que desplaza rápidamente a la célula, del movimiento por arrastre de corrientes de convección o del movimiento browniano de las bacterias inmóviles

Tinciones

Las coloraciones de bacterias tienen por objeto:

- aumentar el contraste de las células con el medio, lo que permite distinguir forma y tamaño

- diferenciar grupos bacterianos por su reacción frente a ciertos colorantes

- evidenciar ciertas estructuras internas (endoesporas)

Los colorantes usados son sales en las cuales el anión o el catión son responsables del color (colorantes ácidos y básicos, respectivamente). Las bacterias tienen afinidad por los colorantes básicos, como el azul de metileno o el cristal violeta. Cuando se usan colorantes ácidos como la eosina y la nigrosina, estos no se unen al citoplasma cargado negativamente, sino que se depositan alrededor de

ellas coloreando el fondo y contrastando con las células incoloras (coloración negativa o indirecta).

Coloraciones simples: usan un solo colorante, como el azul de metileno, safranina, cristal violeta. Todas las células se tiñen uniformemente.

Coloraciones compuestas, cuando se emplean dos o más colorantes. La coloración diferencial, como la de Gram, es una coloración compuesta.

Preparación de un frotis

extendido del material (cultivo sólido o líquido) sobre un portaobjeto limpio y desengrasado con alcohol. Si se parte de material sólido (alimentos, suelo, colonias sobre agar) colocar una gota de agua en el portaobjeto y disgregar el material en una fina capa sobre el vidrio con ayuda del ansa

secado: en forma lenta y evitando ebullición del agua del frotis (las células se aglomeran y resulta dificultosa su visualización)

fijado: mata y fija a los microorganismos, coagulando el citoplasma y permite su adhesión al portaobjeto. Si esta etapa no se realiza correctamente, las células se lavan y se pierden en la tinción. Se usa el calor: cortando la preparación 3-4 veces en el cono azul del mechero de gas, sostenida con una pinza de madera. Se pueden usar otros procedimientos, como la fijación por metanol, formol, que permite observar mejor células animales o vegetales que pueden acompañar a las bacterias

Ejemplo de coloración simple: una vez frío el frotis se coloca en un soporte adecuado sobre una pileta y se le agrega el colorante (azul de metileno, por ejemplo), durante 1 minuto, se lava al chorro suave de la canilla o con ayuda de una piseta, se seca con papel absorbente del lado de atrás y cerca de la llama del mechero. Se observa a x40 y luego con inmersión (x100) con una gota de aceite.

Coloración diferencial (Gram): evidencia diferencias en la composición física y química de las bacterias y permite diferenciarlas entre si:

Gram positivas, retienen el primer colorante- cristal violeta o violeta de Genciana- y se ven violetas y **Gram negativas,** que se decoloran con alcohol, acetona o mezcla de ambos y se se tiñen con el segundo colorante, como la safranina y se ven rosadas. El complejo formado por el cristal violeta y el iodo del lugol (mordiente) es extraído, mientras que en las G^+ esto no ocurre por una diferente composición y estructura de la pared celular (capítulo 2).

Las levaduras, eucariotas con paredes gruesas pero sin peptidoglicano, se tiñen como $Gram^+$, en este caso no es la composición química sino la estructura física de la pared lo que le confiere la Gram positividad.

Técnica coloración de Gram

- colocar el frotis sobre un soporte para tinciones

- cubrir con solución de cristal violeta y dejar actuar 1 minuto

(cristal violeta, 2g con 20mL etanol 96%, oxalato de amonio 1% (v/v). Disolver el colorante en etanol, agregar el oxalato de amonio y dejar 48h antes de usar, filtrar por papel colorantes viejos)

- lavar suavemente con agua de la canilla

- cubrir con lugol y dejar 1 minuto, lavar de la misma forma.

(Lugol: iodo 1g, ioduro de K, 2g, agua destilada 300mL : disolver el iodo y el IK en agua, dejar de un día para el otro para disolver completamente, guardar en frasco oscuro)

- cubrir con solución de safranina y dejar 1 minuto. Lavar y secar

(safranina: 2,5% (p/v) en alcohol 95%, 10mL, agua destilada 100mL)

- observar en inmersión: G^+ violetas, G^- rosadas y determinar forma y tamaño relativo

Coloración de esporas

- preparar un frotis pasando 10 veces por la llama para fijar

- colocarlo sobre un soporte que permita calentamiento

- cubrir con pequeños trozos de papel de filtro, impregnarlos con solución de verde de malaquita y calentar con mechero suavemente por 5 minutos, evitando ebullición, agregar colorante de ser necesario.

(Verde de malaquita: 0,5g, agua destilada 100mL)

- lavar con agua

- contrastar con solución de safranina 30 segundos

- lavar con agua, secar y observar en inmersión

Las esporas se ven verdes y las células vegetativas rosadas. Sin teñir se pueden observar en microscopio de contraste de fases y muchas veces se aprecian en la coloración de Gram de cultivos viejos.

Cápsulas

- Colocar una gota de tinta china en un portaobjeto limpio y mezclar con una ansada de cultivo

- Cubrir con cubreobjeto y observar en inmersión

Las cápsulas (definidas) y las capas mucosas (más laxas) se ven como zonas claras alrededor del organismo sobre un fondo oscuro (coloración negativa)

Siembra y aislamiento

Sembrar o inocular es introducir artificialmente un inóculo microbiano en un medio adecuado, con el fin de estudiarlo, propagarlo, aislarlo en cultivo puro. Puede realizarse en medio sólido, semisólido o líquido, con ayuda de ansa, pipeta, punta, hisopo.

En medio líquido: en matraces, tubos, fermentadores industriales. El crecimiento se manifiesta por enturbiamiento (velo, película, sedimento) y/o por desaparición de un sustrato o aparición de productos del metabolismo (determinaciones químicas de amonio, nitratos, sulfatos, etc.).

En medio sólido: en tubos o placas de Petri

Tubos con agar inclinado (pico de flauta) para sembrarlos se mueve el ansa o la punta cargada con el inóculo sobre la superficie del agar con movimiento en zigzag desde el fondo a la parte superior, cuidando de no romper el agar

Agar parado: se siembran introduciendo la punta hasta el fondo y levantandola suavemente (siembra en picadura)

Siembra en placas

en superficie: por bañado, colocar 0,1-0,5mL de la muestra con pipeta estéril en el centro de la caja y distribuir a toda la caja con un rastrillo de vidrio estéril

en estrías, cargar el ansa y efectuar estrías paralelas en la cuarta parte de la caja, se quema el ansa y se enfría, se gira la caja 90º y se vuelve a estriar tocando 3-4 veces el área sembrada inicialmente y cubriendo otro cuarto de caja. Por último, sin quemar el ansa, se estría el resto de la superficie sin sembrar. De esta forma se facilita el aislamiento de colonias

por inclusión: colocar 1mL de la muestra en una caja de Petri estéril y vacía, sobre ella se agregan 15-20mL de medio de cultivo fundido y mantenido en sobrefusión a 45ªC, se agita la placa para mezclar intimamente, moviéndola 4 veces en sentido horario, 4 en sentido contrario y hacia ambos costados, antes de que el agar se solidifique.

Las cajas se incuban invertidas, para evitar que el agua de condensación caiga sobre el medio dando crecimiento confluente e impidiendo la formación de colonias.

Cada célula viable dará origen a una colonia, de modo que la siembra en placas se usa para cultivar, aislar y contar a los microorganismos.

Aislamiento: obtención de cultivos puros, se realiza en en forma directa (por agotamiento en superficie sólida), cuando la muestra contiene al microorganismo en cantidad adecuada, o por enriquecimiento previo, cuando se encuentra en baja densidad. Se aumenta el número de microorganismos del tipo deseado por pasaje en medio líquido, en condiciones selectivas. El aislamiento termina por agotamiento en medio sólido (colonias).

Cultivo puro: a partir de colonias del mismo tipo se realiza un examen microscópico a fin de mostrar células se-

mejantes en relación al Gram y a su morfología. Puede ser necesario efectuar un reaislamiento.

Conservación de cultivos: *en el refrigerador*, en tubos de agar inclinado: deben efectuarse repiques cada 3-4 meses para evitar desecación del medio

congelados: a -20 y a -70ºC en tubos eppendorf con el medio líquido y 50% de glicerol estéril (se evita el congelamiento que puede dañar a las células)

liofilizados: tratamiento que deseca a los cultivos aplicando ciclos de vacío y congelamiento. Los cultivos se conservan desecados en ampollas de vidrio. Al usarlas se les agrega medio de cultivo líquido y se incuba.

Indicadores biológicos en estudios de ecología microbiana

Actividad respiratoria

(Frioni, 1999, Paul y Clark, 1996)

Se evalúa el CO_2 liberado por el suelo solo (respiración endógena) y/o con el agregado de sustancias cuya degradación y efecto sobre la microflora se desea estudiar (hidratos de carbono, abonos verdes, pajas, fertilizantes, pesticidas), por técnicas de absorción en el infrarrojo, cromatografía gaseosa, conductividad eléctrica, gravimetría o volumetría (luego de absorberlo en solución alcalina).

Analizaremos la técnica volumétrica

Técnica

- 100 g de suelo fresco o seco al aire y tamizado (2 mm), de humedad conocida, solo y con los aditivos que se desean estudiar, se colocan en recipientes de vidrio que se puedan cerrar herméticamente de un volumen de aproximadamente 1 litro (3 repeticiones). Se puede reducir proporcionalmente las muestras: por ej. 30 g. en recipientes de 250mL.

- se lleva a humedad fija (por ejemplo 75% de la capacidad de campo o la deseada) y se mezcla

- colocar un vasito en el fondo del frasco (o en sistema suspendido desde la tapa) con 15 mL de solución NaOH 0,5 N y cerrar herméticamente

- incubar a 28ºC 7-10 días

- preparar blancos de reactivos (sin suelo)

- determinar el CO_2: transvasar el contenido del vaso interno a un erlenmeyer de 125 mL con ayuda de agua

- agregar 5 mL solución de Cl_2Ba 2% y 2-3 gotas de fenolftaleína (0,1% en etanol al 70%)

- valorar desde bureta con ClH 0,5 N (valorado con carbonato de calcio anhidro) hasta desaparición color rosa: gasto = GM

- igual procedimiento para los blancos, gasto = GB

Cálculos

a)

$$\frac{\text{mg C-}CO_2\text{/100 g suelo seco}}{\text{7 días a 28ºC}} = \frac{\text{(GB-GM) N(HCL) 6 x h x 100}}{\text{peso de la muestra}}$$

6mg= equivalente en C del HCl 1N porque:

CO_2 (44g)——C (12g) PE=PM/2

$h = \frac{100 + H\%}{100}$ factor de corrección de humedad para llevar los cálculos a suelo seco a 105ºC

H% = humedad referida a peso seco a 105ºC

b) coeficiente de mineralización del carbono en 7 días:

$$C_m = \frac{\text{(mg C-}CO_2\text{/100 g)}}{\text{C org.\% (g/100 g)}} \times 100$$

Expresar el numerador y denominador en las mismas unidades (mg/100g/mg/100g), por ejemplo multiplicar el numerador por 10^{-3}

c) **coeficiente respiratorio** = qCO_2= C-CO_2/C-biomasa microbiana

Valoración del ácido clorhídrico

Pesar exactamente 0,5g de CO_3Na_2 anhidro (mantenido 24h en estufa a 105ºC y luego en desecador hasta uso), colocar en Erlenmeyer de 250mL disolver en agua (3 repeticiones), agregar gotas de azul de bromo timol (disolver 100mg de colorante con 1,5mL de NaOH 0,5N en un

mortero, llevar a 100mL con agua). Valorar con el ácido 0,5N hasta viraje.

PE CO_3Na_2 anhidro = 53g

Cálculo de la normalidad:

N-real x gasto= N-teórica x 18,87mL

$$\text{N-real} = \frac{0{,}5 \times 18{,}87}{\text{gasto}}$$

Biomasa microbiana

Esta importante y dinámica fracción de los ecosistemas (carbono, N, P, orgánico que se encuentra en células microbianas vivas) se evalúa por:

Recuentos microbianos y cálculo de la biomasa (kg/ha) conociendo el peso promedio de los organismos en estudio: se expresa en kg biomasa/ha (capítulo 8)

Técnica de fumigación/inoculación (FI) de Jenkinson y Powlson (1976), por análisis del C-CO_2 liberado en muestras de suelo previamente fumigadas con cloroformo, desfumigadas y posteriormente inoculadas con suelo fresco y otras muestras con suelo sin fumigar y de fumigación-extracción (FE).

Técnica:

- las muestras de suelo, frescas o secadas al aire y tamizadas a 2 mm se dividen en dos partes de 50 g cada una, una de ellas se expone a los vapores de cloroformo puro, obtenidos al efectuar vacío en desecador de vidrio cerrado herméticamente, con las muestras de suelo en tapas de cajas de Petri y el cloroformo en vasito central. Colocar papel humedecido con agua en las paredes para evitar la desecación

- dejar en contacto con los vapores por 24 h a 25ºC

- retirar el resto del cloroformo y desfumigar por repetidas aspiraciones con bomba de vacío hasta desaparición del olor típico del cloroformo

- llevar a los recipientes para evaluar desprendimiento de CO_2 y a capacidad de campo o a la humedad deseada con agua e inocular con 0,4% de suelo fresco, mezclado cuidadosamente con el resto del suelo

- el suelo no fumigado se mantuvo el mismo período a 28ºC y luego se llevó a la misma humedad

- las muestras se incuban en frascos herméticamente cerrados para la evaluación del CO_2, con 20 mL NaOH 0,5N

- evaluar a los diez días de incubación a 28ºC (procedimiento ya analizado)

- las muestras no fumigadas se incuban por otros 10 días con soda fresca

Resultados:

Biomasa (mg C-CO_2/100 g suelo seco) = X-Y/k donde:

X = mg C-CO_2/100 g suelo fumigado, reinoculado e incubado durante 0-10 días

Y = mg C-CO_2/100 g suelo no fumigado e incubado entre 10 y 20 días (dato más representativo para muchos autores de la actividad de la microflora del suelo, al eliminarse el efecto del pre-tratamiento de la muestra: secado al aire, tamizado, rehumedecimiento)

k = constante determinada por varios autores, se usa en general 0,45, que representa la fracción de la biomasa total del suelo que puede ser mineralizada en estas condiciones (10 días, 28ºC)

Biomasa como fracción del C%

Se expresa la proporción del carbono orgánico total que es biomasa viva

$$\text{C-biomasa\%} = \frac{\text{mg C-}CO_2\text{/100 g suelo}}{\text{C\% (g/100)}} \times 100$$

Nota: igualar las unidades en numerador y denominador.

Se pueden expresar los resultados como **N-biomasa** procediendo a extraer el N-NH_4^+ de las muestras incubadas

con KCl 2N y valorando con electrodos específicos o destilación por arrastre de vapor. **P-biomasa:** extrayendo el P soluble luego de las incubaciones.

C-biomasa por el método de fumigación-extracción

(Vance *et al.*, 1987)

El cloroformo es un biocida efectivo que actúa sobre los lípidos de las membranas, lisando a las células pero no solubiliza a la materia orgánica del suelo ni la hace más biodegradable. Los contenidos de las células lisadas se extraen con solución salina de sulfato de potasio.

Materiales

desecador con conexión a vacío, bomba de vacío
cloroformo puro, libre de etanol
K_2SO_4 0,5 M
Agitador
filtros
ácido sulfúrico concentrado
$K_2Cr_20_6$ 0,0667M
estufa a 150°C
espectrofotómetro
curva patrón (glucosa, ftalato de K)

Técnica

- Proceder como en la técnica de FI con las muestras fumigadas (F) y no fumigadas (NF)
- Extracción del C-biomasa en muestras fumigadas (F) y no fumigadas (no F) con K_2SO_4 0,5M en relación 1:5 (suelo/solución). Ej: 10g suelo con 50 mL K_2SO_4 0,5M (en frascos con tapa rosca)
- Agitar 30 minutos en agitador eléctrico
- Filtrar con papel filtro Nº 42 plegado y recoger en recipientes con tapa. El pH de los filtrados debe estar entre 6,5 y 6,8
- Guardar en congelador si no se analizan el mismo día
- Técnica: colocar 4 mL de extracto en un tubo de digestión de vidrio con tapa rosca, añadir 1 mL $K_2Cr_20_6$ (0,0667M) y 5 mL ácido sulfúrico concentrado. Tapar no herméticamente
- Colocar en estufa a 150º C por 30 minutos. Incluir un blanco con agua en lugar del extracto
- Dejar enfriar a temperatura ambiente por 30´ y luego en agua 15´
- Medir en espectrofotómetro a 600 nm y comparar con curva patrón (ajuste a una recta), realizada con glucosa o ftalato de potasio (ej: solución madre de ftalato de K: 6,382 g/L posee 3,0 g/L de C), a partir de ella se efectúan diluciones
- Se puede leer hasta 24 h más tarde

$$\text{C-biomasa/100g suelo seco} = (\text{CF} - \text{C noF}) \frac{50}{4} \times 10 \times 2{,}64 \times h$$

CF = valor C-suelo Fumigado
C noF = valor C- suelo no Fumigado
2, 64 es el factor de corrección propuesto por los autores (aproximadamente un 38% del C-biomasa total es evaluado en estas condiciones)
50 = vol. de extracción de 10g de suelo, 4mL, alícuota analizada

$$h = \text{factor de corrección de humedad} = \frac{100 + H\%}{100}$$

N-biomasa por la técnica de fumigación-extracción

(Brookes *et al*., 1985, Schinner *et al*., 1996)

- Fumigar el suelo como para la determinación del C-biomasa, pero no eliminar el cloroformo. Mezclar el suelo fumigado con solución de sulfato de potasio 0,5M (1/4 partes), agitar por 30 minutos y filtrar (triplicado). Repetir el procedimiento en suelo sin fumigar
- Analizar los filtrados por N% por el método de Kjeldahl (o guardar a 4ºC hasta análisis)
- El N-total del filtrado se convierte en N-biomasa

$\mu gN\text{-biomasa}.g^{-1} = \frac{S\text{-}C \cdot h}{0,54}$

S= media de las muestras C= media de los controles
h= factor de corrección de la H%

0,54 = fracción del N-biomasa mineralizado en las condiciones de la experiencia

Variante: con reactivo ninhidrina

- Fumigar el suelo húmedo con cloroformo durante 10 días a 25ºC. Repetir el procedimiento para el suelo no fumigado. Tres repeticiones

- Extraer el suelo con KCl (2M) (1/5 partes) y filtar

- El N-aminoácidos de los filtrados se evalúa en la reacción con la ninhidrina: en tubo de ensayo mezclar: 0,1 mL de los filtrados con 0,5 mL de sol. de citrato de Na (0,4M) y agitar bien. Agregar 0,5 mL de la mezcla de reactivos:

ninhidrina en etilenglicol monometileter, 4% p/v, cloruro estañoso: 80mg $Cl_2St.2H_2O$ en mezcla de 25 mL de buffer de acetato de sodio, 50 mL del reactivo de ninhidrina y 25 mL de agua destilada.

- Los tubos se colocan en baño María por 30 minutos, luego se enfrían bajo agua de la canilla y se le agregan 5mL de etanol

- Agitar los tubos y medir absorbancia a 570nm frente a blancos de reactivos, antes de 1 h

$\mu g\ \text{ninhidrina-N}.g^{-1} = \frac{S.V.h}{g}$

(g) Peso suelo (alícuota del filtrado)

S= valores medios de las muestras, V= volumen de extracción. h= factor de corrección de la H%

Solución estandar stock (28 µg N-leucina.mL^{-1})

Disolver 0,262g de leucina en 100mL de HCl 0,1M, llevar el volumen a 1000mL con agua destilada en balón aforado.

Solución de trabajo (2,8 µg N-leucina.mL^{-1}): en frasco aforado de 100 mL, diluir 10 mL de la solución estandar y llevar a volumen con agua destilada. Preparar diluciones para constuir la curva de calibración y proceder igual que para las muestras.

P-biomasa por la misma técnica

(Brookes *et al.,* 1982)

Se determina por la diferencia en P extraíble entre muestras fumigadas y no fumigadas Fumigar las muestras (3 repeticiones) con cloroformo por 24h a 25ºC, como precedentemente

- Agitar las muestras y los controles (no fumigados) por 30 minutos solución de bicarbonato de sodio (0,5M, pH 8,5: disolver 42g de $NaHCO_3$ en 700mL agua destilada, ajustar el pH a 8,5 con NaOH 1M y llevar a 1Lcon agua). Relación 1g suelo/20mL. Filtar

- Tomar 5-10mL de los filtrados de las muestras y los controles para P-soluble: ajustar el pH a 5,0 con ácido sulfúrico y llevar a 20mL con agua destilada

- Agregar 16 mL de heptamolibdato de amonio (0,01M =disolver 12,6g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ en 400mL de agua destilada caliente, enfriar y agregar 140mL de ácido sulfúrico concentrado (96-98%). Luego de enfriar llevar a 900mL con agua destilada y agregar 0,5g de tartrato de antimonio y potasio). Agregar 2 mL de ácido ascórbico (4,4g en 1L agua destilada) y mezclar

- Luego de 15 minutos medir el color de la mezcla a 882 nm frente a los blancos de reactivos (sin suelo)

$\mu gP.g^{-1}\text{suelo seco} = \frac{(S\text{-}C).\ 20,\ h}{1g\ \text{suelo X alícuota del filtrado}}$

S= media P en muestras
C= media P en los controles
h= factor de corrección de la H%
20=volumen del extracto

Actividades enzimáticas

Deshidrogenasas

(Frioni, 1999; Paul y Clark, 1996; Schinner *et al.*, 1995)

Fundamento: las muestras de suelo se mezclan con cloruro de p-iodo nitrotetrazolium (INT) y se incuban 2 horas a 40° C, el p-iodo formazán formado (rojo) se extrae con acetona, metanol y/o etanol y N-dimetilformamida (1/1), se mide en espectrofotómetro a 464 nm con curva patrón de INTF.

Soluciones

* HCL 3M : 100 mL concentrado (37%) con 300 mL de agua destilada

* Buffer Tris 1M, pH 7,0: 30,28g Tris (hidroximetil-amino-metano) en 200 mL de agua destilada, ajustar pH 7,0 con HCL y llevar a 250 mL en matraz aforado.

* Sustrato: 500 mg INT + 2mL N-dimetilformamida, agitar vigorosamente y llevar a 100 mL con agua destilada (aforado). Prepararlo cada vez y guardarlo en oscuridad.

* Solución stock: 100 mg de INTF/mL (10 mg en matraz aforado de 100mL, diluir con 80 mL de acetona y llevar a 100 con la misma).

* Curva de calibración: añadir 0, 1, 2 y 5 mL de INTF estándar en 4 tubos y llevar a 13,5 mL con solución de extracción (acetona), Corresponde a 0, 100, 200 y 500 mg INTF en el volumen de reacción (13,5mL) (PM = 471,3 g)

Procedimiento

- 1 g suelo húmedo en tubos con tapa rosca, añadir 1,5 mL buffer Tris y 2 mL solución de sustrato. Envolver cada tubo con papel de aluminio para evitar la luz.

- Tapar los tubos, agitar brevemente en vortex, incubar por 2 h a 40ºC en oscuridad en estufa o baño de agua. Control: suelo autoclavado por 20´ e igual procedimiento anterior

- Extracción: 10 mL de acetona a cada tubo, agitar y dejar 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad, agitar fuerte en el vortex cada 20´

- Dejar decantar, si es necesario filtrar y/o centrifugar en tubos eppendorf y medir a 464 nm, acetona como blanco, junto a la curva patrón (no usar celdas de plástico)

Cálculos: Leer en la curva patrón (ajuste a una recta) y calcular

$$\text{mg INTF g}^{-1}\text{ suelo seco/h} = \frac{(S-C) \times h}{2h}$$

S = valor en la muestra
C = control estéril
h= factor de correcciòn de la H%

Se puede expresar la actividad como µLH transferidos/g^{-1} suelo seco multiplicando los mg INTF por 150,35

Hidrólisis del acetato de fluoresceína (*FDA)*

(Alef, 1998)

El método se basa en la estimación de la fluoresceína liberada en suelo tratado con solución de *FDA* e incubado a 24ºC

Soluciones

Fosfato de sodio *buffer* (60mM, pH 7,6), ajustar a pH 7,6 con HCl 0,1N
Acetona
Solución de *FDA* 2mg/mL acetona, guardar a –20ºC
Solución estándar de fluoresceína: 5mg/mL acetona, guardar a –20ºC

Procedimiento

Suelo húmedo se tamiza a 2 mm se guarda a 5ºC antes del análisis.
Tomar : 1g suelo y 20mL fosfato buffer 60mM, en frascos de 125mL y la mezcla se incuba en agitador a 24ºC por 15 minutos, luego 100µL de sol. stock de 2mg/mL de *FDA* (sustrato) a las muestras, no a los controles. Incubar agitando 2 horas a 24ºC

Parar la reacción agregando 20mL acetona (concentración final 50% v/v). Agregar 100 µL de sustrato a los controles. Centrifugar a 6000rpm por 5 minutos, filtrar con Whatman Nº4 y leer D-óptica del sobrenadante claro a 499 mn (si da más de 0,8 diluir las muestras en acetona)

Curva de calibración

Preparar como se señala arriba, de modo que la relación concentración de flouresceína y la densidad óptica sea lineal.

Resultados: **en microgramos de fluoresceína/g suelo seco/hora= mg/kg suelo seco/h**

Fosfatasa ácida y alcalina

(Schinner *et al.*, 1995)

Fundamento: el sustrato empleado es el fosfato de p-nitrofenil. Las muestras se incuban una hora a 37ºC en estufa o baño de agua. El p-nitrofenol liberado por la enzima se evalúa luego de la extracción, se genera color con NaOH y se mide a 400 nm, con curva patrón.

Soluciones:

a) Sustrato para la fosfatasa ácida: disolver 4,268 g de fosfato de p-nitrofenil.6 H_2O disódico en *buffer* para fosfatasa ácida y llevar el volumen a 1000 mL con el mismo *buffer* en matraz aforado (hacerla cada día)

b) Sustrato para OH^-: ídem, pero en *buffer* para fosfatasa alcalina

c) Buffer: 12,1 g tris (hidroximetil) aminometano, 11,6 g de ácido málico, 14 g de ácido cítrico monohidratado y 6,3 g de ácido bórico en 500 mL de NaOH 1 M y diluir a 1000 mL con agua destilada (aforado). Guardar a 4°C

d) Acida: pH 6,5: mezclar 200 mL de stock *buffer* y 500 mL de agua destilada Ajustar a pH 6,5 con HCl, llevar a 1000 mL con agua destilada

e) Alcalina: pH 11: mezclar 200 mL de *buffer* y 500 mL de agua destilada. Ajustar a pH 11 con NaOH y llevar a 1000 mL con agua destilada

f) Solución $CaCl_2$ *0,5 M:* disolver 36,74 g de $CaCl_2.2H_2O$ en agua destilada, llevar a 500 mL en matraz aforado

g) Solución NaOH 0,5 M: disolver 20 g en agua destilada y llevar a 1000 mL con agua destilada

h) Solución estándar stock: 1 mg de p-nitrofenol/mL: disolver 1 g en agua destilada y llevar a 1000 mL. Guardar a 4°C

i) Solución estándar de trabajo: 20 µg de p-nitrofenol/mL: diluir 2 mL de solución estándar en 100 mL de agua destilada

j) Curva: pipetear 0 (reactivo blanco), 1, 2, 3, 4 y 5 mL de solución estándar de trabajo en 6 tubos, ajustar los volúmenes a 5 mL con agua destilada y agregar 1 mL de $CaCl_2$ y 4 mL de NaOH 0,5 M, mezclar bien, filtrar por dos papeles

Se obtiene: **0. 20, 40, 60, 80 y 100 µg de p-nitrofenol**

Procedimiento:

- Colocar 1 g de suelo en tubo con tapa rosca de unos 150mL. (5 muestras = 3 para análisis y 2 para control) agregar 1 mL de sustrato (en *buffer* ácido o alcalino) y 4 mL de *buffer* de distinto pH a 3 de los tubos. A los dos controles agragar sólo 4 mL de *buffer*
- Agitar, tapar e incubar una hora a 37°C
- Agregar 1 mL de $CaCl_2$ y 4 mL de NaOH al control y a las muestras
- 1 mL de solución sustrato (ácido o alcalino) luego de la incubación a los controles
- Para diluir (de ser necesario, si la concentración es muy elevada) agregar 90 mL de agua destilada a las muestras y los controles, agitar brevemente, filtrar
- Medir la densidad óptica a 400 nm y calcular los µg $NP.g^{-1}.h^{-1}$ con ayuda de la ecuación de ajuste a una recta (datos de la curva patrón)

Expresión resultados: **µg** $NP.g^{-1}.h^{-1} = (S - C) \times 10 \times h$

h = factor suelo seco
10 = factor dilución extracto
S =media de muestras
C=media de controles

Diversidad estructural y funcional de comunidades microbianas

Se comentan algunas de las técnicas empleadas en el análisis de la biodiversidad de comunidades microbianas, sin recurrir al aislamiento de los microorganismos, como son el perfil fisiológico de la comunidad o la determinación de moléculas básicas del metabolismo: proteínas totales, ácidos nucleicos, ácidos grasos, isoenzimas, perfil de plásmidos. Los protocolos van siendo modificados por diversos autores y escapan a los objetivos de este texto. Una revisión de estas tecnologías fue efectuada en nuestro laboratorio por Ferrari (2005).

Proteínas totales

Por electroforesis en gel de dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE). Las bacterias crecen en medio EMA líquido, son cosechadas por centrifugación y lavadas 2 veces con buffer 10 mM Tris-HCl, pH 7,0. Muestras con 10-20 mg de proteínas/mL corren en el gel con patrones de PM conocido

Plásmidos

Modificaciones de la técnica de Eckhardt (1978) son empleadas con plásmidos de PM conocido.

Perfil fisiológico de la comunidad

El sistema *Biolog (Biolog,* Inc. Hayward, California), consiste en encubar las muestras de suelo, agua, rizosfera, en placas específicamente diseñadas con 95 orificios con distintas fuentes de carbono y un control con un indicador 2,3,4 trifenil tetrazolio (TTC) que se reduce por la oxidación de los compuestos carbonados a la sal formazan, roja, la que se valora colorímetricamente (Lehman *et al*., 1995), durante algunos días de incubación.

Suelo: se requiere un inóculo transparente, libre de carbono: se realiza extracción con pirofosfato de sodio, y se incuba con agitación 24 horas. El sobrenadante se flocula con sales de calcio y magnesio y la fracción límpida se inocula en cada uno de los hoyos de la placa.

Las comunidades pueden identificarse por la presencia o ausencia de respuestas específicas ante distintas fuentes de carbono (White *el al*., 1998), estableciendo correlaciones entre patrones de utilización de sustratos con ciertas especies bacterianas contenidas en bases de datos.

Es frecuentemente usada para valorar la estabilidad de la comunidad ante cambios en el uso y manejo del suelo.

Variante: medida del CO_2 liberado luego del agregado de sustratos a muestras de suelo contenidas en recipientes cerrados y/o titulación del O_2 consumido.

Análisis de moléculas específicas

Lípidos y ácidos grasos

Fosfolípidos *(PLFA, phospholipids fatty acids)* muy útil para evaluar la biomasa viable global y la proporcióin relativa de grupos microbianos diferentes (Pinkart *et al*., 2002), se analizan los cambios en la integridad de las membranas de los microorganismos, luego de la muerte celular y se valora el fosfato lipídico total por colorimetría.

Técnica: (Zelles, 1996, 1999)

- Limpiar meticulosamente los materiales a emplear parta evitar contaminaciones

- Las muestras se conservan a -80ºC o liofilizadas (sin aditivos)

- Se extraen los lípidos con cloroformo/metanol, con agregado de tampón fosfato en caso de suelos muy arcillosos (separación de fases): 100g de suelo en balón de fondo redondo de 1L + 200 mL. de sol. de fosfato buffer (0,05M, pH 7,4) + 500 mL. de metanol y 250,L. de cloroformo.

- Agitar vigorosamente en agitador 2h, agragr 250,L. de agua destilada y 250,L. de cloroformo y dejar toda la noche. Retirar la fase acuosa

- El extracto lipídico disuelto en cloroformo se pasa por columna de sílice y se recogen las fracciones: neutra de glucolípidos (ácidos grasos libres, esteroles, quinonas, tri-glicéridos, poli hidroxialcanos) y la polar, por elusión con solvente con gradiente de polaridad (fosfolípidos)

Análisis de los ésteres metilados de los ácidos grasos (*FAME, fatty acids methyl esters*)

Sistema de identificación bacteriano que ha sido desarrollado por *Microbial ID Inc.* y se conoce como sistema ***MIDI.*** Consiste en el análisis cromatográfico en fase gaseosa de los ésteres metilados de ácidos grasos derivados de la membrana y de los lipopolisacáridos. Se usa mucho en taxonomía (sistema taxoquímico) y existe base de datos con más de 8.000 bacterias analizadas.

Requiere el aislamiento de microorganismos y su cultivo en medio de agar-soja tripticasa (TSA) a 25ºC. El método no se presta para análisis de organismos no cultivables. A partir del análisis *FAME* a extractos de lípidos se puede determinar la biomasa microbiana, el nivel nutricional y la composición de la comunidad de diversos suelos (Hitzl *et al.*, 1997)

Acidos nucleicos

(Kowalchuk *et al.,* 2004)

Las metodologías moleculares basadas en estudios de los ácidos nucleicos constituyen ramas importantes de analisis que permiten:

i) Evaluación de la hibridación en la comunidad

ii) Análisis del *fingerprinting* de la comunidad

iii) Estudio de la fracción activa de la comunidad

Se requiere el aislamiento previo de los microorganismos o de los ácidos nucleicos de las muestras del ecosistema

Extracción de los ácidos nucleicos

- Extracción de células microbianas del suelo y luego se obtiene el ADN de las mismas

- Extracción directa del ADN del suelo por lisis, siguiendo los siguientes pasos: lisis de las células bacterianas, separación del ADN de otros componentes de las células como polisacáridos y proteínas, remoción del ADN de la matriz del suelo y precipitación de ADN.

Las técnicas no son sencillas y muchos de los pasos señalados deben ser repetidos a los efectos de evitar interferencias con las partículas del suelo, el humus, las arcillas.

Se remite a Saano y Lindström, 1995, Miller *et al.*, 1999, Roose-Amsaleg *et al.*, 2001.

Lisis celular: tratamientos químicos (detergentes o cloroformo para desarticular las membranas), enzimáticos (lisozima, enzimas proteolíticas) y físicos (calentamiento, congelamiento-descongelamiento, ultrasonido). La eficiencia de la extracción en la lisis no es siempre alta y todos los procedimientos tienden a obtener alto rendimiento de ADN, de alta **pureza,** evaluada por distintos métodos: electroforesis en gel de agarosa: 0,7-1,2%, con controles de PM conocido, pasaje por columnas de sílica gel, precipitación con acetato de amonio, filtración en Sephadex G-200 (una de las más recomendadas).

Rendimientos: del orden de 50μg/g de suelo, con fragmentos de ADN de 500-1000pb hasta 25KB, según los procedimientos empleados.

Caracterización de los ácidos nucleicos

Reacción en cadena de la polimerasa

La mayoría de las técnicas amplifica la muestra de ADN por la reacción en cadena con polimerasa (*Polymerasa Chain Reaction, PCR*), técnica que ha revolucionado las metodologías en biología molecular y es un protocolo necesario en laboratorios de microbiología ecológica (Josephson y Pepper, 1998, Rodríguez y Frioni, 2003).

Un protocolo de *PCR* da sólo una idea básica del procedimiento y para cada especie de ADN particular que se desea amplificar, los cebadores (*primers)* a usar y las condiciones deben estandarizarse en cada caso y es necesario ajustar la técnica.

Se revela la presencia o ausencia de una secuencia de ADN de interés en el suelo, pero no indica su concentración. Para esto se están implementando nuevas técnicas que usan cromatografía líquida de alta presión (*HPLC*) o la detección de cebadores marcados con fluorescencia.

Polimorfismo en los fragmentos de restricción del ADN del genoma o de plásmidos luego de tratamiento con enzimas de restricción

(restriction fragment lenth polymorphism, RFLP) (Schneider y De Bruijn, 1996).

Mapas detallados usando estos marcadores están disponibles para el hombre y un número de especies vegetales, animales y microoganismos de importancia agronómica. La identificación de rhizobios mediante un código de barras (*ADN fingerprinting)* ha permitido su seguimiento en ambientes contaminados, como lo es el suelo.

Polimorfismo en los fragmentos de restricción terminales

(*TRFLP, Terminal Restriction Fragment Length Plymorphism)* (Dunbar *et al*., 2001)

Constituye uno de los métodos más eficaces en ecología microbiana para comparar répidamente la diversidad de secuencias del ADN bacteriano extraídas de muestras del ambiente, amplificadas por *PCR.* Se basa en la variación de la posición de los sitios de restricción entre secuencias y en la determinación del largo de fragmentos terminales marcados con fluorescencia, mediante electroforesis en gel de alta resolución. Se excluyen del análisis los fragmentos que no son terminales ya que no se marcan y no se observan en el gel. El largo y la secuencia de los fragmentos de ADN marcados se determinan en secuenciador automático.

Electroforesis en gel con gradientes desnaturalizantes y de temperatura

(DGGE, Denaturing Gradient gel Electrophoresis; TGGE, Temperatura Gradient Gel Electrophoresis) (Garland, 2004)

Al aplicar voltaje al gel, los fosfatos del ADN cargados negativamente, causan migración de la molécula hacia el ánodo. Para cada molécula de ADN existe un sitio del gel donde se detiene. Asi aparecen varias bandas. En estas técnicas se produce la desnaturalización de las moléculas de ADN extraído de los suelos, como consecuencia de los cambios en la fuerza iónica de las soluciones empleadas. Con un gradiente de temperatura sucede lo mismo, se separan gradualmente las dos hebras de la molécula, hasta alcanzar la temperatura de fusión, donde el estado bicatenario deja de presentarse a lo largo de toda la molécula.

Los pasos iniciales en esta técnica son las mismas que para *TRFLP*: aislamiento del ADN, purificación y amplificación por *PCR*. Luego los productos se separan por estos métodos electroforéticos. El comportamiento de estas moléculas se compara con el de otras moléculas de secuencia conocida, para verificar las proporciones de migración y su PM.

(CG)%: por esta técnica es posible deducir el contenido de este par de bases, más resistente a la desnaturalización.

Las moléculas presentes en las bandas se pueden extraer y caracterizarse a partir de su secuenciación.

Hibridación en la comunidad y empleo de sondas génicas

Esta técnica es muy empleada para determinar la presencia de organismos de interés en ambientes naturales. El fenómeno se basa en la eficiencia y velocidad en que moléculas del ADN de hebra simple se asocian para formar moléculas de doble hebra híbrida, siguiendo el principio de complementariedad de bases.

El sondeo génico aprovecha la habilidad del ADN de ser desnaturalizado (el ADN se desenrolla en dos hebras simples) y renaturalizado (hibridación entre moléculas simple hebra del mismo individuo o de la misma especie) y la posibilidad de hibridación entre una molécula de ADN blanco y una molécula específica, más pequeña, denominada **sonda génica.** Se pueden formar híbridos y reconocer, identificar, y caracterizar la presencia de ciertas secuencias génicas en un genoma o fragmento del mismo.

Para construir sondas se requiere experiencia en investigación y fuerte base de biología molecular (Josephson y Pepper, 1998). Usualmente se envían a construir las sondas a centros especializados. Las de ácidos nucleicos son trozos de ADN de simple hebra marcadas para facilitar su detección (ejemplo con los genes de la fijación de nitrógeno).

También se puede hibridizar una colonia: tocando con papel de filtro para adherir algunas células de cada una en el papel. Se lisan sobre este papel y se realizan los pasos necesarios para permitir la hibridación con la son-

da, como desnaturalización de las moléculas, agregado de *buffers,* establecimiento de temperatura adecuada, etc.

Solo las colonias que contienen la secuencia específica de ADN darán una señal colorimétrica o radioactiva.

También se puede realizar el proceso en bacterias fijadas en portaobjetos.

Técnicas de estudio de la fracción activa de la comunidad

Nuevas técnicas permiten establecer perfiles moleculares de la fracción activa de la comunidad, que escapan a este texto.

Se mencionarán sólo algunas:

- análisis de los ARN mensajeros codificados por genes específicos que se recuperan a partir de muestras de diversos ambientes y que poseen particularidas como vida media de sólo unos minutos y son producidos inmediatamente antes de la síntesis proteica

- se analizan también los ARN ribosomales constituyentes de la maquinaria de traducción. Su contenido es proporcional a la actividad microbiana y su determinación resulta muy útil en estudios de ecología genética

En la figura 1 se esquematizan algunos de los análisis de la fracción activa de comunidades microbianas. Se citarán dos de ellos: hibridación fluorescente *in-situ (FISH)* y la de microarreglos (*microarrays).*

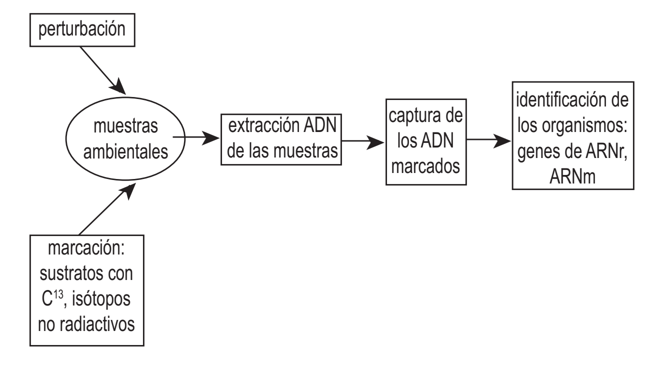


Figura 1- Estudios de la comunidad microbiana luego de una perturbación

Hibridación i*n-situ* fluorescente *(FISH)*

(Aman, 1995) (capítulo 8)
Emplea sondas conjugadas con colorantes fluorescentes y permite el examen microscópico.

No es necesario cultivar al microorganismo e implica el uso de sondas de oligonucleótidos marcados con fluorescencia (15-25pb) en combinación con técnicas de biología molecular y microscopía.

Existen más de 1000 sondas presintetizadas disponibles, muchas para los ARNr 16S bacterianos.

Técnica:

- *Fijación* de los microorganismos, con etanol, metanol, aldehidos (3-4% de formaldehído) para bacterias G^- y 50% etanol, etanol/formol o calor para las $Gram^+$. Pueden requerirse otros pasos de permeabilización de las células (lisozima para $Gram^+$ e hidrólisis ácida moderada (1M HCl), para micobacterias

- *Hibridación:* el *buffer* con formamida y las sondas fluorescentes se precalientan y se adiciona a las muestras (de 30 minutos a varias horas de incubación en cámara húmeda, oscura y a 37º- 50ºC). Las condiciones adecuadas para la complementación se pueden regular con la concentración del formaldehído, que debilita los puentes de H y variando la temperatura de hibridación

- *Lavado*: con agua desionizada y/o *buffer* salino (0-900 mM NaCl) para remover la sonda no hibridada.

- *Detección:* microscopia variada: epifluorescente, microscopio laser confocal o citometría de flujo

En poblaciones activas con síntesis proteica en células en división o no, los niveles de ARNr son altos y se obtienen señales importantes. En contraste, con bacterias con carencias nutricionales, en estrés o cerca de la fase de muerte, los niveles de ARNr son bajos y hasta indetectables.

La técnica es muy usada para microorganismos en muestras ambientales y médicas. Los protocolos y sondas están disponibles. Es de resaltar que no se requieren pasos

de purificación ni de amplificación, lo que facilita el trabajo (Garland, 2004).

Contraindicaciones: interacciona negativamente la autofluorescencia de muestras de suelo; no todos los organismos se permeabilizan en la misma forma por los protocolos disponibles; resulta difícil la cuantificación en *biofilms* y/o agregados microbianos.

Microarreglos *(microarrays)*

Se usa como un análisis de expresión del genoma en su totalidad, para explorar cuales de las expresiones génicas son reordenadas en determinados microorganismos en respuesta a cambios en el ambiente (variaciones de pH, temperatura, potencial redox, nutrientes, xenobióticos). Se pueden reconocer genes inducidos o reprimidos en las diferentes condiciones (Wilson *et al.,* 2002).

- primero se amplifican las secuencias clonadas y almacenadas de los genes a estudiar por *PCR* obteniendo clones de moléculas de ADN copia, luego de su purificación, cien o mil de estas sondas de ADN copia diferentes se unen directamente a la superficie sólida de placas (vidrio, plástico, sintéticas).

- una alícuota de cada muestra es ordenada y dispuesta en los pozos microcópicos de la placa, usando un sistema robótoco de alta velocidad controlado por computadora

- el ARN total de muestras testigo y de referencia se marca por fluorescencia o radioactividad, con ciclo de transcripción reversa

- las moléculas marcadas se mezclan y se someten a hibridación con los ADN copias en la placa

- luego de incubación, se leen las placas por las marcas incorporadas: las emisiones producidas generan un espectro carácterístico en aparatos adecuados (escaner, microscopio laser confocal)

- las imágenes son importadas a un *software* específico en el cual son superpuestas y coloreadas

- la información sobre las secuencias de los ADN clonados, el nombre de los genes, intensidad de emisión, se correlacionan con cada señal detectada

- los datos de cada hibridación simple que ocurre en cada pozo de la placa, se obtienen según la poporción normalizada de señales

- las desviaciones significativas a partir de 1 (no cambio), representan aumentos (>1) o disminuciones (<1) de los niveles de expresión génica en referencia a la muestra testigo y se crean asi perfiles de expresión génica

Metagenómica

Constituye un nuevo concepto en el estudio de las comunidades microbianas, conjugándose todas las técnicas de genética molecular en una unidad llamada metagenómica que involucra el estudio de los genomas colectivos de los microorganismos en las comunidades, como las del suelo.

Se clona el ADN extraído del suelo en amplios fragmentos (100kb) en hospederos cultivables que luego se analiza por secuenciación, clonación y con el uso de genes reporteros para estudios de actividad, como la ß galactosidasa, por el gen l*acz*, luminiscencia, por el gen *lux*, fosfatasa alcalina, por el gen *pho*A, etc. la actividad puede evidenciarse e medios de cultivo sólidos o líquidos (Josephson y Pepper, 1998).

Con genes reporteros se puede monitorear la actividad bacteriana en muestras del ambiente *in situ* y los estudios prosiguen en la búsqueda de nuevos genes que puedan ser empleados en estos estudios.

Recuentos microbianos

Suspensiones-diluciones del suelo

(capítulo 4)

- pesar 10 g suelo fresco, de contenido de humedad conocido, introducirlo asépticamente en un frasco con 90 mL agua destilada estéril, solución fisiológica (ClNa al 0,85%) u otro medio mineral

- agitar en agitador magnético un tiempo establecido (10 minutos), se obtiene así la dilución 1/10 = 10^{-1} (se puede partir de 30 g en 270 mL, etc.)

- tomar 1 mL de la primera suspensión-dilución y pasarlo a otro tubo con 9 ml de agua estéril (dilución 10^{-2})

- proceder como anteriormente hasta la suspensión-dilución adecuada según la densidad microbiana de las muestras (10^{-7}, 10^{-8}, etc.). Cambiar los punteros de la pipeta automática en cada paso o usar una pipeta estéril y enjugarla 5 o más veces en una dilución antes de pasar a la siguiente

Microflora heterótrofa total

Medio

glucosa	10g
K_2HPO4	0,2 g
agar	15g
extracto de suelo	20 mL
agua	1.000 mL

Extracto de suelo

- autoclavar durante 1 hora a 120ºC 1 kg de suelo fértil y neutro en 1,5 litro de agua corriente

- decantar y filtrar por batería de filtros de papel hasta clarificar

- completar a 1 litro con agua destilada

- repartir en pequeños volúmenes y esterilizar 20 minutos a 120ºC y guardar hasta su uso

- Repartir el medio de cultivo fundido en cajas de Petri estériles de 15-20 mL cada una y dejar solidificar

- sembrar en superficie 0,1 mL de suspensiones-diluciones altas: 10^{-5} en adelante, 3 cajas/dilución

- incubar las cajas invertidas a 28-30ºC y leer entre el 5º y 8º día

- contar las cajas que contengan entre 30 y 300 colonias, efectuar promedio de las tres cajas y multiplicar por la inversa de la dilución y por el factor de corrección de la humedad. Ejemplo:

  promedio colonias en 3 cajas de dilución 10^{-7} = 58
  H% = 20 y h = 1,20

Nº microorg./g suelo seco=$58 \times 10^7 \times 1,20 = 69,6 \times 10^7 = 7,0 \times 10^8$

Actinomicetes

Medio

glicerol	10g
asparaginato de Na	1g
K_2HPO_4	1g
agar	15g
agua destilada	1000 mL

Proceder como anteriormente para el recuento; colonias típicas, secas, adheridas firmemente al medio.

Hongos

Medio

peptona	5g
glucosa	10g
KH_2PO_4	1g
$MgSO_4$	0, 5g
agar	2g
sol. acuosa de Rosa de Bengala al 1/300	100 mL
agua destilada	900 mL

Agregar en cada caja estéril 1 mL de solución de sulfato de estreptomicina (75 mg/100 mL) esterilizada por filtración con filtros millipore de 45 micras y luego el medio en sobrefusión

Se emplea también:

extracto de malta	20g
agar	20g
agua	1L

- luego de esterilizado y en sobrefusión bajar el pH a 4,5-5,0 con ácido láctico y/o cítrico

Algas

Medio

KH_2PO_4	0,5g
$NaNO_3$	0,5g
$MgSO_4$	0,15g
$CaCl_2$	0,05g
NaCl	0,05g
$FeCl_3$	0,01g
agua corriente	1000mL

- Incubar a la luz con burbujeo de aire, seguir el enriquecimiento por el incremento de los pigmentos y efectuar aislamientos en el mismo medio sólido.

Protozoos

Medio

NaCl	5g
agar	10g
agua destilada	1000mL
pH neutro	

- Repartir en cajas de Petri y antes de solidificar colocar anillos de vidrio estériles, o perforar el agar con sacabocado y sembrar toda la caja con cultivo denso de una bacteria, como *Aerobacter* sp.

- inocular con 0,05 mL de las suspensiones-diluciones de suelo en cada orificio, incubar a 28ºC

- examinar luego de 15 días el desarrollo colocando la caja sobre la platina del microscopio

- se observan los protozoos por su movilidad, a bajo aumento

Grupos fisiológicos

Su estudio se realiza empleando **medio y/o condiciones de cultivo selectivos**, que permiten poner en evidencia organismos que realizan determinado proceso metabólico: celulolíticos (aerobios o anaerobios), fijadores de nitrógeno, etc. Los recuentos se efectúan en

I. medio sólido, sembrando un volumen conocido de las suspensiones-diluciones en **superficie o en inclusión** (antes de agregar el medio sobrefundido y a menos de 40ºC el que se mezcla íntimamente con el inóculo antes de solidificar)

II. medios líquidos que se siembran con una alícuota de las suspensiones-diluciones a razón de 3 o 5 tubos por cada una. Luego de la incubación se consideran positivos aquellos tubos:

a. que presentan desarrollo (turbidez)

b. o por la desaparición del sustrato o aparición de productos del metabolismo: formación de nitratos a partir de amonio, en los nitrificantes.

Cálculo del número más probable de microorganismos por el método de Mc Crady

- sembrar 3 o 5 tubos por cada suspensión-dilución con 1 mL cada uno

- incubar a la temperatura apropiada y el tiempo requerido en cada caso

- anotar el número de tubos positivos en cada suspensión-dilución

- determinar el número característico (3 cifras): la última dilución (de izquierda a derecha) donde todos los tubos son positivos, es la primera cifra y las dos restantes se forman con el número de tubos positivos en las siguientes diluciones.

Ejemplo

1) 3 tubos/dilución	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Nº tubos positivos:	3	3	3	2	1	0

Número característico: 321 (dilución 10^{-4})

2) 5 tubos/dilución	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Nº tubos positivos:	5	5	5	3	2	0

Nº característico: 532 (dilución 10^{-4})

- determinar el número más probable **(NMP)** de microorganismos, con ayuda de tablas construídas a partir de algunos datos de recuentos de viables en medio sólido (cajas) y luego por cálculos estadísticos se infieren todas las combinaciones posibles. Se entra en la tabla correspondiente con el número característico y se lee en **NMP** en la alícuota sembrada en la dilución correspondiente al primero de los números del Nº característico.

ejemplo 1

Nº característico: 321 (10^{-4}) NMP 15,0 microorganismos en 1 mL dilución 10^{-4}

Nº microorganismos/g suelo seco = 15,0 x 10^{4} x h = 1,5 x10-^{5} x h

ejemplo 2

Nº caract. 532 (10^{-4}) NMP 14,0 microorganismos en 1 mL de la dilución 10^{-4}

Nº microorganismos/g suelo seco = 14,0 x 10^{4} x h = 1,4 x 10^{5} x h

Nota: si se siembra con una alícuota menor de 1 mL es necesario tenerlo en cuenta en los cálculos. Promediar los resultados de las repeticiones efectuadas.

Tablas de Mc Crady

3 tubos/dilución

1	2	1	2	1	2
000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.3	202	2.4	310	4.5
010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	0.7	221	3.0	321	15.0
102	1.1	222	3.5	322	20.0
110	0.7	223	4.0	323	30.0
111	1.1	230	3.0	330	25.0
120	1.1	231	3.5	331	45.0
121	1.5	232	4.0	332	110.0
130	1.6	300	2.5	333	110.0
200	0.9	301	4.0		140.0

1 = Nº característico; 2 = NMP

Ciclo biológico del carbono

Celulolíticos aerobios

Medio

K_2HPO_4	1 g
$NaNO_3$	0,5 g
$MgSO_4$	0,5 g
$FeSO_4$	0,01 g
agua	1 litro

- Repartir en tubos de ensayo a razón de 8 mL cada uno y agregar una banda de papel de filtro como única fuente de carbono y energía
- Esterilizar 20 minutos a 3/4 atmósfera
- Sembrar con 1 mL de las suspensiones-diluciones de suelo (10^{-2}-10^{-7}) 3 o 5 tubos/dilución
- Incubar por 15 días a 28ºC: tomar como positivos los tubos en donde se visualice el ataque al papel, pigmentación, desarrollo microbiano. A veces es necesario evaluar la integridad del papel con ayuda de un ansa: positivo, si éste se disgrega con facilidad
- Expresar los resultados: Nº celulolíticos / g suelo seco con ayuda de la tabla de Mc Crady.

Aislamiento en medio sólido

- Sembrar con una alícuota de las diluciones más concentradas (10^{-1}) la superficie de caja de Petri con el medio anterior solidificado con 15 g/L de agar. Colocar encima un disco de papel de filtro estéril del diámetro de la caja. Incubar
- Observar colonias típicas en zonas atacadas del papel
- Efectuar una coloración Gram de un trocito del mismo, describir los organismos dominantes y su relación con las fibras de celulosa.

Amilolíticos

Medio

solución salina estándar	50 mL
extracto de suelo	10 mL
almidón	1,5 g
NH_4NO_3	1,0 g
agua	940 mL
agar	20 g

Solución salina estándar

K_2HPO4	5 g
$MgSO_4$	2,5 g
NaCl	2,5 g
$Fe_2 (SO_4)_3$	0,05 g
$MnSO_4$	0,05 g
agua	1 litro

- Recuento en medio sólido: como para microflora heterótrofa total
- Recuento en el mismo medio líquido: inocular 3 o 5 tubos/dilución (1 mL). Incubar 15 días
- **Lectura**: pasar 1 mL de cada tubo a un tubo vacío de hemólisis; agregar 1 gota de reactivo iodo-iodurado (Lugol): iodo= 10 g; IK= 25 g; agua= 1 litro. Agregar 2-3 ml de agua. Tubos **(+)** ligeramente coloreados de amarillo; tubos **(-)** color azul a violeta y marrón.

Nota: Se emplea también caldo simple o agar simple con 0,2% de almidón u otro azúcar cuya utilización se desee estudiar.

Caldo simple**: peptona, 10 g; NaCl= 5 g; extracto de carne= 10 g; agua= 1 litro**

Ciclo biológico del nitrógeno

Fijación por organismos en vida libre y en la rizosfera

Aislamientos y recuentos

Azotobacter* y *Derxia	**medio LG** (Döbereiner, 1980)
sacarosa	20 g
K_2HPO_4	0,05 g
KH_2PO_4	0,15 g
$CaCl_2$	0,01 g
$MgSO_4$ 7 H_2O	0,20 g
$Na_2MoO_4 2H2O$	0,002 g
$FeCl_3$	0,01 g
azul bromotimol (0,5% en etanol)	2,0 mL
$CaCO_3$	1,00 g
agar	15 g
agua	1 litro
pH	6,8 (color verde)

Para ***Derxia*****:** reemplazar sacarosa por almidón o glucosa, omitir el carbonato de calcio y agregar 0,01g $NaHCO_3$

***Azospirillum* (NFb)**	(Döbereiner, 1980)
ácido málico	5,0 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4$ 7 H_2O	0,2 g
NaCl	0,1 g
$CaCl_2$	0,02 g
Na_2MoO_4 2 H_2O	0,002 g
$MnSO_4 H_2O$	0,01 g
Fe EDTA 91,64% peso/vol, agua)	4,0 mL
azul bromotimol (0,5% p/vol. en etanol)	3,0 mL
KOH	4,5 g
biotina	0,1 mg
agua	1 litro
pH 6,8 (color verde) antes de agregar el agar **(semi-sólido)**	**1,75 g agar**

- Distribuir en frascos chicos de antibióticos (7-10 mL) a razón de la mitad de su volumen, esterilizar como de costumbre.

Nota: Para realizar cajas agregar 20 mg extracto de levadura y 15 g de agar/L.

Determinación del efecto rizosférico (R/S) de vegetales sobre estos diazotrofos

- plantas de gramíneas se llevan al laboratorio con el pan de suelo, se corta la parte aérea y se sacude la raíz con suaves movimientos: el suelo que queda adherido se considera rizosférico **(R)**
- colocar la raíz en erlenmeyer de 250 mL y peso seco conocido con 100 mL de agua destilada estéril o solución NFb salina (sin azúcares)
- agitar 10 minutos a 70 rpm en agitador eléctrico
- decantar y realizar suspensiones-diluciones (10^{-1}-10^{-4})
- retirar la raíz con pinza, enjuagarla con agua que se recoge en el erlenmeyer. Este se lleva a estufa a 105ºC para evaporar toda el agua y determinar peso seco del suelo rizosférico (peso erlenmeyer con suelo seco-peso erlenmeyer vacío). Colocarlo en desecador con Cl_2Ca o sílico gel para enfriarlo antes de pesar.
- con suelo no rizosférico **(S)** realizar suspensiones-diluciones (10^{-1}-10^{-4})

Azotobacter

- inocular 3 cajas/dilución con 0,2 ml de suspensiones-diluciones
- 10^{-1}-10^{-4} del suelo **(S)** y del **(R)** del erlenmeyer inicial y 10^{-1}-10^{-3}
- extender el inóculo en toda la superficie con varilla de vidrio doblado 90º, secar a estufa a 37ºC e incubar invertidas a 28ºC
- leer entre 5-7 y hasta 14 días: colonias típicas transparentes, brillantes, distinguir de contaminantes.

Cálculo de R/S, como se explicó anteriormente

Azospirillum

- inocular 3 frascos/dilución con 0,1 mL cada uno en el medio semi-sólido, con las mismas suspensiones-diluciones que para ***Azotobacter,*** incubar a 28ºC
- leer entre los 3- 5 días por la aparición de una película sub-superficial, determinar el número característico y calcular la densidad con ayuda de la tabla de Mc Crady
- verificar capacidad de fijación del N_2 de las películas, sustituyendo el algodón de los frascos por tapón de goma y precinto de aluminio, medir reducción del acetileno a etileno (actividad nitrogenásica)
- efectuar observaciones morfológicas de los cultivos y aislamientos en cajas de medio NFb con extracto de levadura (N combinado); las colonias aparecen en 1 o 2 días, pero se dejan incubar por 1 semana; son blancas, secas y pequeñas y frecuentemente se introducen en el agar. Verificar su capacidad de reducir el N_2 en medio semi-sólido, sin N

$$\textbf{(R/S)} = \frac{\text{Nº m.o./g suelo rizosférico}}{\text{Nº m.o./g suelo no rizosférico}}$$

Actividad nitrogenásica (Döbereiner, 1980)

Reducción del acetileno a etileno en raíces cortadas

- recoger las plantas temprano en la tarde para permitir máxima acumulación de fotosintetizados, separar la parte aérea y exceso de suelo y colocar las raíces en recipientes con agua destilada, llevar inmediatamente al laboratorio
- colocar las raíces en frasco que pueda cerrarse herméticamente: de suero, tipo antibiótico o los empleados como biberones, tapar con tapón de goma y precinto de aluminio. Reemplazar el aire por N_2 y 5% de aire, dejar a temperatura ambiente toda la noche para superar la fase de latencia en la reducción observada en gramíneas
- reemplazar un 10% de la atmósfera por acetileno y 1% O_2
- incubar a 32ºC y efectuar mediciones en las 2 o 3 horas a partir de 0,5-1 mL de muestra tomada con jeringa de plástico, en cromatógrafo de gases con columna de Porapax Q, N o T a 80ºC temperatura y 100ºC en el inyector, gas portador: N_2
- los picos de etileno se comparan con los producidos en las mismas condiciones y sensibilidad por muestras de

etileno puro diluido en frasco de antibiótico cerrados. El etileno se consigue en pequeños balones o se prepara por reducción del etanol con ácido sulfúrico

- los resultados se expresan en micro o nano moles de etileno (nM C_2H_4/g raíz seca/hora)

- efectuar dos controles: raíz sin acetileno (producción endógena del mismo) y otro con acetileno, sin raíz (impurezas de etileno)

En cilindros de suelo con planta entera
- introducir un cilindro de acero abierto en ambos extremos, alrededor de las plantas y retirar el sistema radical lo más intacto posible. Sellar sobre un plato de plástico en la base

- colocar en bolsa de polietileno, tipo Saran dejando la parte aérea libre, sellar alrededor del tallo con banda de goma y solución de agar (7 g/L) luego de unas 24 horas en invernáculo para equilibrar el sistema

- una tubuladura lateral de goma permite efectuar los intercambios gaseosos. Si no se cuenta con medidor de flujo para volúmenes grandes, se puede generar el acetileno en la bolsa a partir de carburo de calcio y agua. A los efectos de calcular el volúmen de la bolsa y posibles pérdidas se introduce volumen conocido de **propano**, como estándar interno

- leer luego de 1-2 horas de introducción del acetileno

- efectuar blanco de suelo sin plantas

Asociación *Rhizobium*-leguminosa

(Balatti y Jardim Freire, 1996; FAO, 1983 y 1984; Duhoux y Nicole, 2004; Graham y Vance, 2000; Milnitsky et al., 1997; NifTAL, 1981)

Aislamiento de rhizobios a partir de nódulos (figura 1)
- lavar cuidadosamente las raíces noduladas bajo el agua de la canilla

- elegir nódulos grandes y vigorosos, separarlos de la raíz dejando pequeña porción de ésta a cada lado del nódulo

- **Desinfección**: colocar los nódulos en tubo de ensayo con tapa rosca o en sistema preparado cortando jeringas de plástico y adhiriendo con banda elástica en un extremo del cilindro una gasa para sumergirlo en las distintas soluciones : alcohol 70% durante 1 minuto, cambiar a NaClO al 2% por 3-5 minutos, agitando, lavar 5-6 veces con agua destilada estéril

- **Maceración** del nódulo con auxilio de varilla de vidrio, bisturí o ansa estéril, puede efectuarse entre dos portaobjetos o en un borde de la tapa de la caja donde se efectuará el aislamiento, con unas gotas de agua

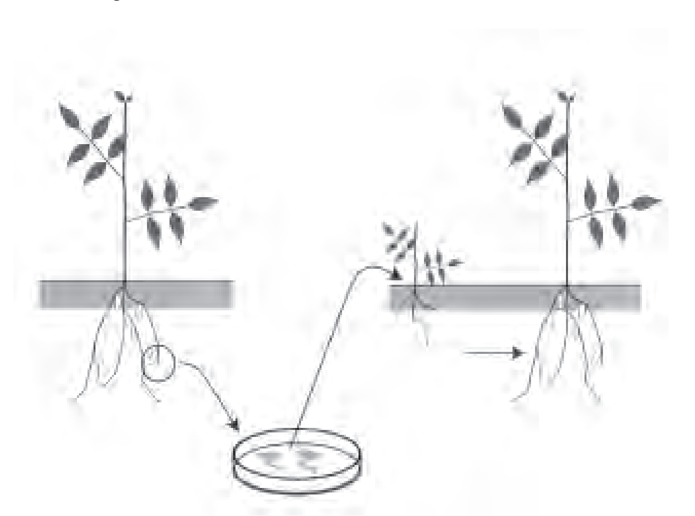


Figura 1- Aislamiento de rhizobios a partir de nódulos e inoculación de plántulas

Aislamiento

1. *en superficie:* sembrar por agotamiento con ansa en superficie de medio **EMA (extracto de levadura manitol agar)**, llamado también M-79, con rojo Congo

2. *en inclusión:* colocar 1 mL de agua estéril en 3 cajas de Petri vacías. Con el ansa flambeada tomar contenido nodular y diluirlo sucesivamente en las 3 cajas. Agregar el medio en sobrefusión (menos de 45ºC) y por repetidos movimientos mezclar con el inóculo

- incubar las cajas en posición invertida a 28ºC: las colonias de rhizobios de crecimiento rápido aparecen a los

2-3 días y las de crecimiento lento, al cabo de 1 semana. Son grandes, incoloras, mucosas, de superficie lisa y brillante. Los contaminantes generalmente se colorean con el rojo Congo, aunque hay excepciones como *Agrobacterium radiobacter* y cultivos viejos de rhizobio

- repicar las colonias representativas en tubos de agar inclinado con medio EMA con azul de bromotimol

Medio EMA con rojo Congo

manitol	10 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4$ 7 H_2O	0,2 g
NaCl	0,1 g
extracto de levadura	1 g
agar	15 g
rojo Congo (sol. acuosa 1/400)	10 mL
agua destilada	1 litro

Medio EMA con azul de bromotimol

- el mismo medio anterior: se sustituye el rojo Congo por 1 mL por litro de solución alcohólica al 1,6% de azul de bromotimol. Ajustar el pH 6,8-7,0, repartir en frascos (para preparar cajas) o en tubos de ensayo, esterilizar e inclinar antes de solidificar

Selección de cepas de rhizobio

Se realiza a tres niveles: **laboratorio, invernáculo o cámara controlada y campo**. Se parte de una colección de cepas autóctonas y otras cedidas por centros de colección.

- **Desinfección de las semillas**: colocar la cantidad de semillas de leguminosas necesarias, de buen poder germinativo, en un frasco y sumergirlas en alcohol a 70%, agitando por 3-5 minutos. Volcar y agregar hipoclorito de sodio al 2%, por 3-5 minutos. Lavar varias veces con agua destilada estéril.

- **Germinación**: en los mismos recipientes se pueden distribuir las semillas sobre las paredes con una pequeña cantidad de agua del último lavado, o bien colocarlas sobre la superficie de agar-agua o medio EMA sin colorante, o sobre algodón y papel de filtro en cajas estériles, para su germinación a la oscuridad y temperatura adecuada a cada leguminosa.

- **Siembra e inoculación**

Para leguminosas de semilla pequeña (*Medicago, Trifolium*, etc.) tubos grandes (19 x 2 cm) con 25 mL de medio salino para plántulas, como el de Jensen **:**

$CaHPO_4$	1,0 g
K_2HPO_4	0,2 g
$MgSO_4$ $7H_2O$	0,2 g
NaCl	0,2 g
Cl_3Fe	0,1 g
agua	1 litro
agar	8 g
pH	6,8-7,2

- sembrar dos plántulas por tubo con ayuda de ansa

- llevar a solario y a la semana inocular con 0,2 mL de una suspensión densa de células (10^9/mL) de las cepas a estudiar (el contenido de un tubo de agar inclinado crecido 2-3 días se suspende con 5 mL de agua estéril). Efectuar 8 o más repeticiones de cada tratamiento

- se incluyen dos testigos:

  T = sin inocular y sin nitrógeno
  N = 0,2 mL solución KNO3 al 0,05%

- llevar a cámara de cultivo con temperatura, fotoperíodo e intensidad luminosa controlados de acuerdo a la leguminosa con que se trabaje. Las raíces no deben quedar expuestas a la luz. Los nódulos comienzan a aparecer en las primeras semanas. Anotar fecha de inicio de nodulación y aspecto de ésta

- **Evaluación:** la experiencia concluye cuando se observa la máxima diferenciación entre los tratamientos **(T) y (N)**, pero antes que los primeros comiencen a secarse (6-8 semanas). Con ayuda de ansa o varilla se sacan las plantas con el medio, se corta la parte aérea, se coloca en sobre de papel con su correspondiente numeración y se determina su peso fresco y luego su peso seco a 65ºC, hasta peso constante.

- El N% de la parte aérea y la producción de N por tubo se realiza por la técnica de semi-micro Kjeldahl, aunque en este primer ensayo suele efectuarse determinaciones de peso seco de la parte aérea y nodulación: número, peso de los mismos a 65ºC, ubicación velocidad de aparición.

Para para leguminosas de semilla grande (soja, maní, poroto)

- se emplean unidades de siembra mayores, como las clásicas **botellas de Leonard**: botellas comunes de unos 700 mL a las que se les quitó el fondo y que van invertidas sobre un frasco de boca ancha (1 litro) con solución nutritiva para plántulas que asciende por capilaridad a través de una mecha de gasa enrollada, a la botella invertida llena de arena fina lavada y neutra o vermiculita donde se desarrollará el sistema radical. Todo el dispositivo sin la solución se envuelve en bolsa de papel y se esteriliza en autoclave; antes de su uso se le coloca solución nutritiva (Jensen, Norris, etc.) Pueden hacerse más chicos, o **con dos vasos de plástico** uno con arena/vermiculita y con una mecha no degradable sumergida en la solución del vaso externo.

- **Siembra**: con semillas desinfectadas o con plántulas creciendo asépticamente, o micropropagadas, 5-6 semillas para luego ralear a 2 por dispositivo

- **Inoculación:** puede incluirse con la semilla (peleteada) o agregarse una vez emergidas las plántulas a razón de 1 mL de suspensión con 10^9 células/mL por cada planta. Cuando las plantas están establecidas, se cubre la superficie de arena con 2-3 cm de arena parafinada o trozos de espuma plástica para evitar desarrollo de algas y excesiva evaporación

- **Incubación:** el ensayo (cepas y testigos) se lleva a cámara de cultivo controlado o invernáculo. Se repone la solución a medida que se requiera, alternándola con agua estéril

- **La evaluación** es la misma que efectuamos en el ensayo de laboratorio

Ensayos de invernáculo o cámara con suelo

- se emplea suelo seco al aire y tamizado o bien cilindros intactos de suelo que se obtienen en el campo con ayuda de un cilindro metálico que se entierra para extraer un pan que se coloca luego en bolsas duras de plástico o en macetas. En este caso no hay alteración del mismo.

Pero son sin duda los ensayos de campo los que permitirán emitir opinión más acertada sobre el comportamiento simbiótico de combinaciones rhizobio-leguminosa.

Ensayos de campo

- **Elección del lugar**: los suelos con bajo número de rhizobios y nitrógeno disponible son probablemente los más útiles para el ensayo de cepas, pero para probar otras cualidades además de la eficiencia, como la capacidad competitiva, se requiere una alta población de rhizobios nativos. El lugar debe estar lo suficientemente nivelado para evitar el lavado luego de una lluvia y la contaminación de las parcelas. Elegir el diseño experimental más conveniente

- **Tratamientos al suelo:** si el propósito es comparar la eficiencia de un grupo de cepas, las demás condiciones no deben ser limitantes: nivel mínimo de fertilidad, pH, dosis de inoculante, riego para evitar pérdidas por sequía, etc. Por el contrario, si se desea comparar la capacidad de las cepas para sobrevivir y nodular en el campo, las condiciones deben ser las naturales

- **Inoculación**: a menos que el ensayo se establezca para comparar distintos métodos de inoculación, ésta debe efectuarse según las normas de práctica común en la zona. Se desea establecer entre 1.000 a 10.000 rhizobios viables/semilla

- **Evaluación:** en el momento del raleo ya se aprecia nodulación, pero ésta se evalúa al comienzo de la floración, en unas 10 plantas por parcela: número y peso seco de los mismos. **Cosecha**: una superficie determinada (1 m^2) para cultivos forrajeros y las líneas centrales para los cultivo de grano. **Se evalúa**: peso fresco y seco de la parte aérea, N% y producción de nitrógeno por hectárea. En caso de granos: número de cajas o vainas por planta, peso seco de las mismas y de los frutos, N% de frutos y se calcula la **producción de nitrógeno** = N% x materia seca(kg/ha)

- **Interpretación de los resultados:** análisis estadístico: varianza y diferencias entre medias de tratamientos, correlaciones, etcétera.

Preparación de los inoculantes

La bacteria seleccionada se cultiva en medio líquido con agitación hasta altas densidades (10^8 células/mL).

El inoculante puede ser líquido o sólido.

Algunos inoculantes se distribuyen en pequeña escala en agar, o en bolsas de plástico con caldo de altísima concentración celular e incluso algunos se expenden como cultivos liofilizados (pastillas).

Inoculantes líquidos se usan cuando existe buena coordinación entre el laboratorio y las tareas de campo y son útiles a nivel experimental (solario, invernáculo) o cuando se observan fallas en la aplicación de otros tipos de inoculantes en el campo y se desea salvar el ensayo, se riega el surco con un cultivo denso de la bacteria. Actualmente se vuelven a emplear para inocular grandes áreas de leguminosas, como la soja en Brasil y Argentina. La botella o recipiente de plástico se adosa a la sembradora y el inoculante convenientemente diluido, gotea sobre las semillas a medida que son sembradas.

Inoculantes sólidos, son muy usados sobretodo cuando se separa en el tiempo la producción de su empleo. En general el soporte sólido es la **turba**, tierra con alto contenido de materia orgánica (60-70%), pero si no se dispone de buenas turberas, se han ensayado otros soportes: lignita, cáscara de cereales molida, **polímeros orgánicos (poliacrilamida, alginatos) o minerales** como arcillas, tierra de diatomeas, etc.

Se usa: **turba estéril** por rayos gamma o en autoclave en las bolsas de poliestireno que luego se inoculan con el caldo con ayuda de una jeringa y aguja estéril. Se deja madurar para que la bacteria se multiplique en el soporte. Actualmente casi todos los inoculantes emplean turba estéril para evitar disminuciones del inóculo por la competencia de hongos, actinomicetes y otras bacterias (en general las turbas aceptan igual volumen de caldo sin aparentar estar mojada).

Control de calidad de los inoculantes

Como todo producto biológico pueden perder calidad por mutaciones en los cultivos o por descenso del número de células viables. Se tiende a que la producción de inoculantes sea una actividad privada y que el estado cuente con laboratorio de control responsable de:

- **seleccionar y proveer a los industriales cepas de rhizobios** debidamente seleccionada para cada leguminosa

- **controlar la calidad** de los cultivos durante su desarrollo (caldos) y en el producto final, en la fábrica y en los lugares de distribución, rechazando aquellos que no contengan el número mínimo exigido (en Uruguay es de 2 x 10^9/gramo producto fresco) o limitando el período de uso a menos de 6 meses.

- **conducir áreas de investigación** para superar problemas asociados con la elección de las cepas y su sobrevivencia en el producto final.

Técnicas de inoculación

En semillas:

- **en seco**, consiste en mezclar el inoculante en el depósito de semillas de la sembradora; ambos productos van cayendo en el surco. A pesar de que no hay un contacto íntimo entre el inóculo y la semilla, muchos productores lo prefieren por la comodidad que significa no emplear agua.

- **húmedo,** se mezcla la turba con la semilla y la mínima cantidad de agua, en general con un adhesivo, como leche, azúcar o adhesivos comerciales (**inoculación simple)**

- **pildorización, o "*pelleteo*"**, se mezcla la semilla con el inóculo y un adhesivo como solución de goma arábiga, celofax A, otros derivados celulósicos, etc. y luego se recubre ésta con un polvo fino: carbonato de calcio, para los rhizobios de crecimiento rápido que acidifican, o fos-

fato de roca o dolomita para los de crecimiento lento, que alcalinizan.

Esta técnica aumenta las posibilidades de nodulación exitosa en: suelos ácidos, siembra aérea, siembra demorada por causas climáticas, germinación retardada por falta de humedad, pero suele secar el preparado, por lo que su uso debe controlarse. Algunos países expenden la semilla **pre-inoculada**, con 10^5 rhizobios/semilla. En muchos casos se recomienda el pellet múltiple o "**super *pellet***" para obtener semillas con elevado número de rhizobios, mejorando el establecimiento en casos en que la densidad de cepas nativas infectivas sea muy elevada.

En el suelo

Cuando se aplican pesticidas, o cuando la semilla puede dañarse fácilmente con el manipuleo como en el caso de la de maní, se pueden aplicar técnicas de inoculación al suelo con formas líquidas o granuladas de inoculantes.

- **granular**, en general son a base de turba preparados como las raciones de animales, comprimiendo pequeños cilindros. Son comunes con aplicaciones de insecticidas y herbicidas. Se aplican debajo de la semilla en el surco y resulta ser un método muy eficaz en la inoculación en maní, soja y otros cultivos. El inoculante se puede colocar a la distancia que se desee de la semilla.

- **líquidos** se emplean al igual que los anteriores cuando se desea evitar el manipuleo de la semilla, pero se requiere transporte de agua y maquinaria con pulverizador.

- **otros tipos** se extiende el uso de inoculantes donde los microorganismos se atrapan en geles de **poliacrilamida** y otros productos como **alginato, xantano**, que protegen a las células. Se mostraron tan eficaces como los inoculantes a base de turba, con la ventaja de que se puede inocular muchos días antes de la siembra (30 o más días).

Inoculante a base de alginato de calcio

(figuras 2 y 3, Frioni *et al.*, 1994)

- Esterilizar alginato de sodio al 4% en agua (es muy viscoso)

- Mezclar en partes iguales con cultivo denso de rhizobio, *Frankia, Azospirillum,* hongos micorrícicos u otro microorganismo a ser empleado como inoculante con el alginato, que queda al 2%, mantenerlo en agitación con barra magnética

- Preparar solución del cloruro de calcio al 1% estéril y agitada con barra magnética.

- El inoculante se forma dejando caer gotas de medio-alginato sobre el cloruro de calcio, con pipeta o filtro de porcelana con pequeños orificios. Se forman pequeñas esferas de alginato de calcio (**gel**) con las células atrapadas que se lavan para eliminar exceso de Cl_2Ca con agua estéril y se dejan secar una noche bajo flujo laminar. El gel desecado ocupa pequeño volumen y se mantiene en frascos o bolsas en lugar fresco hasta su uso.

- Se puede colocar este preparado seco junto con la semilla o previamente se disuelve en *buffer* fosfato, pH 7,0 o *buffer* de citrato de sodio, igual pH.

La figura 2 muestra un sencillo dispositivo para preparar inoculantes con bacterias, *Frankia*, en este caso, incluida en la matriz de alginato de calcio. El peso seco de estas bolitas fue de 1,2 a 1,9 mg. La figura 3 presenta el aspecto de este inoculante antes del secado al aire, con distintas concentraciones de bacteria, coloreado con INT (iodo-nitrofenil tetrazolio) que se reduce a INT-formazán rojo por actividad bacteriana (Frioni, *et al*., 1994).



Figura 2- Inoculantes a base de alginato

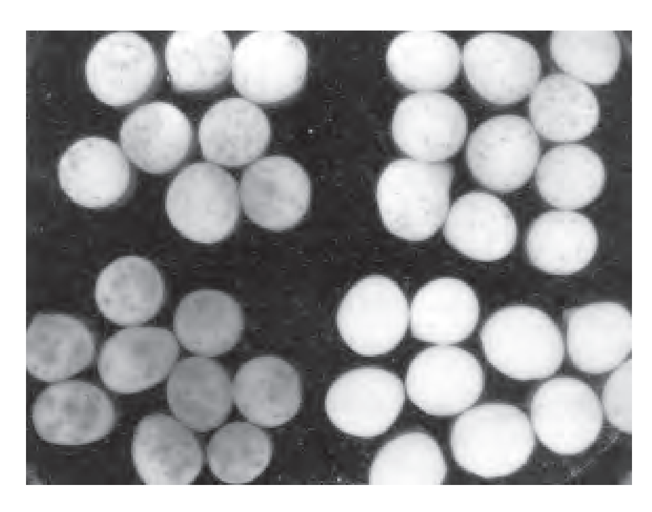


Figura 3- Inoculante en alginato de calcio con *Frankia* a diferentes concentraciones. La coloración roja del INT-formazán permite evaluar la viabilidad de la bacteria

Inoculación simple

- seguir atentamente las instrucciones del inoculante comercial a emplear, preparar el adhesivo y agregar el volumen recomendado

- agregar el inoculante a base de turba u otro preparado siguiendo las instrucciones y mezclar bien hasta eliminación de los grumos

- agregar el inoculante y adhesivo a la semilla y mezclar hasta que toda la semilla quede uniformemente recubierta por una capa negra de inoculante

- extender las semillas inoculadas fuera de la luz directa del sol y dejar orear antes de su empleo

Pildorización (*pelletización*)

- preparar la solución adherente, por ejemplo: celofáx-A 50g/L de agua o solución de goma arábica al 40%, con 24 horas de antelación

- agregar el inoculante y mezclar bien para deshacer los grumos

- agregar la solución adherente con el inoculante a las semillas, mezclar bien hasta que toda la semilla quede recubierta por el inoculante

- agregar de una vez el polvo de recubrimiento mezclando suavemente hasta que toda la semilla quede recubierta y separada

- extender la semilla inoculada al abrigo de la luz solar y dejar orear antes de su empleo

Recomendaciones sobre cantidades de goma arábica e inoculante a emplear en algunas leguminosas

	semillas(g)	inoculante (g)	goma arábiga(mL)
Arachis hypogea	100	10	4,0
Glycine max	100	10	3,0
Medicago sativa	50	0,2-5	4,0
Phaseolus vulgaris	100	8	2,5

Reconocimiento de rhizobios

Serología

Se han empleado las reacciones antígeno-anticuerpo:

- aglutinación: interviene la totalidad de la célula

- precipitación: sólo los antígenos solubles

Obtención de antisuero con alto título por inmunización en conejos; se cultiva el rhizobio en medio EMA, sólido o líquido (este último evita la excesiva acumulación de polisacáridos extracelulares que acumulan muchas cepas), se prepara una suspensión densa (10^8 células/mL) luego de repetidos lavados de las células en solución fisiológica.

- Si se calienta previamente el antígeno 30 minutos a 100ºC se destruyen los antígenos flagelares (H): proteicos y se obtienen los somáticos (0): polisacáridos, proteínas solas o con lípidos. En este caso sólo se pueden efectuar las reacciones de aglutinación, pero si se desea el conejo puede luego volver a ser inmunizado con el cultivo entero y obtener un antisuero completo para reacciones de precipitación.

- **Título:** última dilución en la que se observa aglutina-

ción. Los sueros se conservan congelados, con el agregado de algún antiséptico, en pequeños volúmenes, que facilitan su empleo. La determinación del título puede efectuarse en tubos chicos de hemólisis o en bandejas:

- diluir el antisuero (0,08 mL, con pipeta especial) en un primer tubo con 2 mL sol. fisiológica (NaCl 0,85%), dilución 1/50; llevar 1 mL a un segundo tubo con 1 mL de sol. fisiológica y así sucesivamente (cada uno de los tubos diluye a la mitad) tirar el último mililitro

- agregar a cada tubo 1 mL de suspensión concentrada de antígeno (10^9/mL), agitar suavemente. Tubos control: solución fisiológica (ClNa 0.09%) y antígeno (sin suero) no debe presentar aglutinación

- **lectura**: **rápida**: poner los soportes en baño María a 52ºC y leer en 1-2 horas las reacciones flagelares y en 4 h las somáticas. **Lenta**: a 37ºC los tiempos se extienden 4 horas y toda la noche, respectivamente. Leer en iluminación indirecta contra fondo oscuro. Reacción flagelar: agregados grandes, floculentos, que decantan en forma lenta y que, si van acompañados de reacción somática, dejan una marcada turbidez en el líquido sobrenadante

Reacción somática: comienza con la aparición de granulaciones finas y pueden dar lugar a depósito compacto de sobrenadante transparente.

- **Aglutinación con nódulos triturados**: resulta útil cuando se desea identificar a las cepas que dieron origen a un gran número de nódulos. Se trabaja con el contenido nodular, sin efectuar el aislamiento. Los nódulos lavados se maceran uno por uno en 1-2 mL de sol. fisiológica; se calienta a 100ºC unos minutos y se pipetea unas gotas dentro de pequeños tubos o en bandejas de plástico con cavidades individuales (tipo para ELISA). Se agregan unas gotas de los antisueros de las cepas que se desean identificar, se cubre con un vidrio la bandeja para evitar evaporación y se observa la aglutinación a la media hora.

- **Test de precipitación**: ha llegado a ser muy específico gracias a la técnica de inmunodifusión en gel: se efectúan varias cavidades en agar-agua muy puro solidificado en caja de Petri o sobre un portaobjeto.

ELISA, método indirecto muy sensible que emplea IgG-anticonejo conjugado con fosfatasa alcalina y el sustrato p-nitrofenil fosfato. La enzima libre se lee a 405 nm luego de 30 minutos a temperatura ambiente, con la solución del sustrato como blanco.

Inmunofluorescencia*:* se emplean mucho en estudios ecológicos: se combina el anticuerpo con una sustancia que fluoresce en UV, como isocianato de fluoresceína o naranja de acridina que al reaccionar con el antígeno específico produce una fluorescencia que se visualiza en el microscopio equipado con luz fluorescente

Empleo de cepas marcadas por resistencia a antibióticos

Desarrollo de resistencia a antibióticos

(Lassagno y Frioni, 1988)

- conocer la resistencia natural de las cepas a emplearse en la inoculación de leguminosas

- seleccionar mutantes en cajas con medio EMA con y sin antibiótico (dosis creciente), por ejemplo con estreptomicina y espectinomicina

- transferir colonias de cepas resistentes a medio EMA líquido y a agar inclinado

- sembrar cepas en caldo con resistencias a estreptomicina a cajas con espectinomicina (y viceversa)

- transferir mutantes dobles a EMA sólido, confirmar resistencia a ambos antibióticos sembrando en cajas con los dos antibióticos

- confirmar la eficiencia simbiótica de las mutantes

- las cepas seleccionadas se siembran (0,1 mL) en cajas: sin antibióticos; con estreptomicina y con espectinomicina para conocer la respuesta a concentraciones de antibióticos

- dividir cada caja en 4 secciones con una fibra, colocar discos con distinta concentración del antibiótico en el centro de cada sección (4 discos/placa); incubar 26-28ºC y observar halos de sensibilidad; se esperan más de 30 colonias resistentes con una velocidad de mutación de 1.10^5 (en muchas cepas esta velocidad llega a 1.10^7

- seleccionar por resistencia a ambos antibióticos

Identificación de las cepas en los nódulos

- preparar cajas de medio EMA (por triplicado) con: estreptomicina 40 µg/mL; espectinomicina, 250 µg/mL y sin antibiótico. Los antibióticos se agregan de solución madre: estreptomicina = 4 mg/mL y espectinomicina 250 mg/mL, esterilizadas por filtración con milipore de 0,20 micras y mantenidas en heladera

- dividir las cajas en unos 20 cuadrados, numerarlos y seguir el modelo

- cada nódulo se separa, se desinfecta y se siembra en un cuadrado

- **Otro método**: separar la raíz con nódulos, colocarla sobre un papel de filtro en caja de Petri estéril, darle un número a cada posición nodular, sacar los nódulos con un bisturí, siguiendo un orden, y sembrar. Se puede así describir que nódulos fueron los formados por la cepa introducida marcada, la localización y distribución de ellos en el sistema radical

- incubar a 28ºC y efectuar observaciones diarias, algún contaminante puede ser resistente a los niveles de antibióticos empleados (cuidar el paso de la desinfección)

- leer por crecimiento en las 3 cajas

- **Informar**: nódulos con cepas resistentes a cada antibiótico y a ambos

Recuento de Rhizobios

1. **Recuento total en cámara: en cámara cuenta-glóbulos** se aplica a cultivos en fase exponenecial de crecimiento, contenidos nodulares, caldos, en el laboratorio o en la fábrica de inoculante, antes de impregnar la turba, donde se postula que todas las células están viables. Puede evaluarse también la turbidez (densidad óptica a 600 nm) frente a escala patrón confeccionada por recuento de viables en caja.

2. **Recuento de viables en medio sólido:** procedimiento habitual a partir de diluciones seriadas de la muestra, por siembra en superficie(0,2mL) o en inclusión (1 mL) en medio EMA. Lectura en cajas con entre 30 y 300 colonias. Se emplea con cultivos puros, con inoculantes a base de turba estéril y también con turba no estéril, ya que los contaminantes pueden ser del orden de 10^6/g y el rhizobio debe superar 10^8/g. En las últimas diluciones predominan las colonias típicas de esta bacteria y pueden contarse.

3. **Recuento de viables en plantas:** emplea la capacidad de cada cepa de rhizobio para nodular con una leguminosa y presume que una sola célula agregada a la planta test puede originar una población que nodule a las leguminosa específica.

- sembrar semillas germinadas estérilmente en tubos con agar-Jensen para las leguminosas de grano pequeño

- a los 7 días inocular 2 tubos con 0,2 mL de cada una de las suspensión-dilución de: suelo, inoculante, etcétera

- evaluar la nodulación; las plántulas que no recibieron rhizobio se marchitan y mueren

- tomar en cuenta el número de tubos positivos (con nódulos) en 4 diluciones con tubos positivos y negativos

- leer la tabla de Fisher y Yates en **NMP** en la alícuota (0,2 mL) de la primera dilución de la izquierda; expersar los resultados por g de suelo o de turba.

Determinación del número más probablemente (NMP) por el método de dilución en planta

Nº unidades positivas en: 4 diluciones en ensayos Duplicado	NMP en la alícuota en: de la menor dilución Cuadruplicado	
8	16	
	15	>700
7	14	690
	13	340
6	12	180
	11	100
5	10	59
	9	31
4	8	17
	7	10
3	6	5.8
	5	3.1
2	4	1.7
	3	1.0
1	2	0.58
0	1	<0.5
	0	

NMP/g turba o suelo = (m x d) / (v x g)
m= NMP de la tabla
v= volumen de la alícuota
d= menor dilución de la serie
g = peso seco de la turba en la dilución inicial
Límite de confianza aprox. al 5%: duplicado = 6 cuadruplicado = 3.5
Efectuar varias repeticiones de cada recuento

- **Para leguminosas de semilla grande** deben emplearse los dispositivos de Leonard o modificaciones que permiten el desarrollo de las plántulas, que ocupan mucho espacio y son trabajosas de preparar, esterilizar, etcétera

- **NMP** de rhizobios usando **bolsas de plástico** para el desarrollo de la leguminosa: bolsas de plástico con un papel de filtro en su interior permite el desarrollo de la raíz y la impregnación con solución mineral. Las semillas pregerminadas se colocan en repliegue superior del papel de filtro (2 semillas para soja y unas 15 para alfalfa) y se inocularon con alícuota de las suspensiones-diluciones de suelo y/o inoculante, a razón de 5 bolsas/dilución. Las bolsas llevan solución mineral para plántulas

- las bolsas se colocan paradas entre soportes metálicos. Se intercalan controles (sin inocular) para observar posibles contaminaciones

- se observa nodulación, se consideran negativas si no los presentan en 2 semanas para alfalfa y 3 para soja

- **NMP** con la tabla de Cochran que reproducimos en parte

NMP para usar con diluciones decimales y 5 tubos por dilución

MNP para los valores de p^3

p^1	p^2	*0*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*
5	0	0.23	0.31	0.43	0.58	0.76	0.95
5	1	0.33	0.46	0.64	0.84	1.1	1.3
5	2	0.49	0.70	0.95	1.2	1.5	1.8
5	3	0.79	1.1	1.4	1.8	2.1	2.5
5	4	1.3	1.7	2.2	2.8	3.5	4.3
5	5	2.4	3.5	5.4	9.2	16	-

Cálculos

p1 es el Nº bolsas positivas en la dilución menos concentrada en donde todas las unidades son positivas, o donde se encuentra el mayor Nº de tubos o bolsas positivos, p2 y p3 son los Nº de unidades positivas en las 2 siguientes diluciones. Leer en la tabla el valor correspondiente a p3: **NMP** en la alícuota de la segunda dilución.

Ejemplo:

	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
positivos:	5	5	3	1	0

p1= 5; p2 = 3 y p3 = 1

NMP = 1,1 en inóculo de 10^{-6} Nº de rhizobios/g = 1,1 x 10^{6}

Nota: Algunos países emplean un método sencillo de evaluar la calidad de inoculantes en turba no estéril: se inoculan unas 50 semillas con una alícuota de inoculante calculada según las indicaciones de la bolsa; se siembran éstas en jarras de Leonard (unas 3-4 por cada inoculante) colocando testigos sin inocular. A las 2-3 semanas se observa nodulación: por lo menos 2 nódulos/planta. Si no se forman estos nódulos, su calidad es inferior, o no posee el inóculo específico.

Simbiosis *Frankia*-no leguminosa

(Frioni *et al*., 1991, 1994; Stowers *et al*., 1987)

Medios de cultivo empleados

QMOD

	g/L sol.final	mLsol.madre	Nº sol.madre
Extracto de levadura	0.5		
Bacto peptona	5		
Glucosa	10		
$MgSO_4$ $2H_2O$	0.2	20	2
KCl	0.2	10	4
Lecitina	5 mg	1	7
FeNa Edta 0.02 M		1	9
Sol. Oligoelementos = a la de BAP		1	10
tampón K_2HPO_4	0.3 g	10	17
NaH_2PO_4	0.26 g		

BAP

	conc.final	g/L	ml sol.madre	Nº sol.
$MgSO_4$ $2H_2O$	0.2 mM	0.05	5	2
$CaCl_2$ $2H_2O$	0.07 mM	0.01	10	3
NH_4Cl	5.0 mM	0.267	5	5
Propionato de Na	5 mM	0.48	5	6
FeNa EDTA	0.02 mM	0.1	1	9
Sol. Oligoelementos			1	10
vit BAP			1	12
tampón KH_2PO_4/K_2HPO_4	10 mM		10	15

Sol. Oligoelementos	(g/L)	vitaminas del BAP	mg/L
H_3BO_3	2.86	HCl-tiamina	10
$MnCl_2$	1.81	ac. nicotínico	50
$ZnSO_4$	0.22	HCl-piridoxina	50
$CuSO_4$	0.08	biotina	22.5
Na_2MoO_4 H_2O	0.025	ác. fólico	10
		pantotenato Ca	10
		riboflavina	10

agar: 12-15 g/L.sol.final **C activo:** 0.15 g/L

Soluciones madre

1) KH_2PO_4 100 g/L

2) $MgSO_4 7H_2 0$ 10 g/L

3) $CaCl_2$ $2H_2O$ 1 g/L

4) KCl 20 g/L

5) NH_4Cl 53,5 g/L

6) propionato de Na 96,1 g/L

7) lecitina 0,5 g/100 mL: disolver 500 mg lecitina de soja en 50 ml alcohol absoluto, agregar 50 mL agua destilada

8) $CoCl_2$ 0,1 g/100 mL

9) FeNa EDTA 0,734/100 mL

10) sol.oligoelementos (son los del BAP)

11) vitaminas base: en 100 ml: tiamina 1 mg (pesar 10 g + 10 mL agua y tomar 1 mL), ác. nicotínico 5 mg y piridoxina 5 mg

12) vitaminas del BAP a 100 mL de la sol. (11) agregar:
1 ml sol. biotina (4,5 mg en 2 mL agua)
1 ml sol. ác. fólico (5 mg en 2 mL agua)
1 ml sol. pantotenato de Ca (5 mg en 5 mL agua)
1 ml sol. riboflavina (5 mg en 5 mL agua)
Filtrar por filtro bacteriológico y guardar en heladera por poco tiempo

13) K_2HPO_4 1M 136,09 g/L

14) K_2HPO_4 1M 174,18 g/L

15) sol. tampón BAP: KH_2P04- K_2HPO_4 pH 6,7: mezclar aprox. 560 m sol. (13) y 320 mL sol. (14) Luego

ajustar a pH 6,7 con ambas soluciones, con ayuda de pH-metro.

16) Tampón QMOD K_2HPO_4 30 g y NaH_2PO_4 20 g en 1 litro

17) Tampón QMOD puede hacerse con sols. (14) y (16), llegando a pH 6,7 con ayuda de ambas.

Aislamiento

Directamente de nódulos

Resulta bastante difícil por la presencia de numerosos contaminantes que se desarrollan en los medios de cultivo empleados. Conviene partir de nódulos frescos. Numerosos desinfectantes superficiales, se han empleado: hipoclorito de Na o de Ca, Cl_2Hg, H_2O_2 OsO_4, glutaraldehido. Procedimientos empleados hasta el presente en el aislamiento de *Frankia*:

centrifugación de nódulos macerados en gradiente de sacarosa, *incubación selectiva* de trozos de nódulos desinfectados en medios ricos, como el QMOD por 6 semanas; los tubos o cajas con turbidez se descartan por los contaminantes

filtración de macerados de nódulos por 52 y 20 micras, los restos nodulares quedan arriba y vesículas u otras estructuras en el de 20 micras; *dilución seriada* y siembra en medios apropiados (pero se requiere alta relación de inóculo para iniciar el desarrollo de *Frankia*)

microdisección, uno de los procedimientos más usados

- lavado de nódulos en agua de canilla, en tamiz
- en caja de Petri con agua, elegir con lupa los lóbulos claros, turgentes
- con ayuda de agujas pelar la corteza y separar pequeñas raíces
- pasar a erlenmeyer estéril tapado y esterilizar superficialmente con sol. al 3% de OsO4, 3' (bajo campana, gases tóxicos). La corteza se ennegrece. Si no se dispone del óxido de osmio, ensayar con hipoclorito de Ca (1,5% P/V); de Na (1% P/V de Cl activo = agua de lavandina al 20%), Cl2Hg,1% acidificado, como para nódulos de leguminosas
- lavar varias veces con agua destilada estéril
- cada lóbulo se fragmenta asépticamente con ayuda de bisturí en fragmentos de aprox. 50-200 micras, que se lavan sobre tamiz de gasa con agua estéril (eliminar taninos y polifenoles tóxicos)
- siembra depositando los trocitos en superficie de medio sólido en medio BAP con o sin C activo o medio más rico QMOD
- puede agregarse una segunda capa en sobrefusión sobre los trozos que facilita la observación posterior al microscopio.
- cerrar las cajas con Parafilm, incubar por 4 semanas a 29ºC
- observar ausencia de contaminantes y colonias típicas de *Frankia* pequeñas, de unos 0,5 mm de diámetro al mes, se aprecian a la lupa: hifas finas creciendo radialmente, algunas cepas forman esporangios y vesículas (éstas sobre todo en medio sin N), y otras pigmentos rojos. Inicialmente difusas, luego más densas. El C activo facilita el pasaje del estado endofítico al saprofítico

Nota: conviene trabajar con nódulos frescos, de otra manera regenerarlos en plántulas hospedantes creciendo en distintos dispositivos: tubos con sol. hidropónica o con medio agarizado, en arena-vermiculita, perlita (en vasos o macetas). El aislamiento es como precedentemente.

Ejemplo de solución mineral: Crone

KCl	0,75 g/L
$MgSO_4 7H_2O$	0,5 0 g/L
KH_2PO_4	0,1 g/L
* $CaSO_4$ $2H_2O$	10 ml/L
* $Ca_3(PO_4)2$	10 ml/L
** oligoelementos	1 ml/L
*** citrato férrico	1 ml/L

- preparar solución de la sal señalada 10 g/L, agitar 10', dejar reposar 1 hora y luego tomar el volumen necesario del sobrenadante

**** Oligoelementos** (g/L)

H_3BO_3	1,5
$MnSO_4$ $4H_2O$	0,7
$ZnSO_4$ $7H_2O$	0,6
$CuSO_4$ $5H_2O$	0,1
(NH_4) $2MoO_4$ H_2O	0,2
$CoSO_4$ $7H_2O$	0,01
*** citrato férrico: cloruro férrico	10
ácido cítrico	10

Inoculación de plántulas

Inóculo

- se puede partir de cultivos de *Frankia* creciendo entre 2 y 3 semanas en medio líquido, (evaluación de la biomasa por reducción de INT, turbidez luego de sonicación, proteínas totales, que se centrifugan y se lavan con agua destilada estéril (2.000 rpm, 15'). Se descarta el sobrenadante y el *pellet* se transfiere a frascos de suero con 15 mL de agua estéril y se disgrega en agitador magnético o bien por pasajes sucesivos por agujas hipodérmicas

- si se dispone de gran cantidad de inóculo, la inoculación puede efectuarse mezclando 5 mL de inóculo en la parte superior del suelo antes de la siembra. De otra forma, es se sumergen las raíces un tiempo en el cultivo.

Mineralización del nitrógeno

Amonificación

Recuentos en medio líquidos

Existen muchos medios y condiciones de cultivo, se usa mucha la asparagina, o la urea, como fuente de C y N:

Medio

sol.salina	50 mL
asparagina	0,2g
agua destilada	950 mL

- inocular 3 0 5 tubos con 1 mL de cada suspensión-dilución del suelo (10^{-3} en adelante)

- incubar a 28ºC por 7 días

- **lectura**: colocar aproximadamente 1 mL de cada tubo a un tubo vacío de hemólisis, agregar 2 gotas de reactivo de Nessler (puede realizarse la lectura en vidrio de reloj o piedra de toque). **Positivo**: enturbamiento amarillo-anaranjado. Cálculo del NMP con tabla de Mc Crady

Reactivo de Nessler

solución A:	I_2Hg	50 g
	IK	36,5 g

Triturar en mortero, agregando de a poco 100 mL agua

solución B:	KOH	150g
	Agua dest.	1 litro

En el momento de usar, mezclar partes iguales de A y B.

- **actividad potencial:** en el suelo mismo, pero en el laboratorio

- **actividad real** (en el campo). El suelo se mezcla con la sustancia orgánica nitrogenada que se va a estudiar (urea, proteina, harinas de cereales, etc.) a la humedad deseada en recipiente herméticamente cerrado, como el usado para la evaluación del CO_2: en el vaso interior se recoge al amonio liberado con sol. 0,2 N de H_2SO_4 que se valora con NaOH de la misma normalidad. Se pueden construir curvas acumulativas de amonio, en el tiempo.

Mineralización del nitrógeno (amonificación) *in-situ*

Una de las técnicas consiste en incubar el suelo con agua, formando un barro que asegura la anaerobiosis, en frascos cerrados. La ventaja de este dispositivo es que no es necesario determinar ni mantener el nivel adecuado de humedad que exigen los procesos aerobios. Se evita la formación de nitritos y nitratos, pero no la pérdida de anhidridos nitrogenados volátiles.

El N-$NH4^+$ se valora luego de 10 días de incubación a 37ºC (ver Análisis Físicos y Químicos)

Coeficiente de mineralización N-orgánico=

$$\frac{N\text{-}NH_4^+ \text{ final- } N\text{-}NH_4^+ \text{ inicial}}{N\text{-orgánico}} \times 100$$

Nitrificación

Recuentos en medio líquido

nitritantes:	sol.salina estándar	50 mL
	$(NH_4)_2 SO_4$	0,5 g
	$CaCO_3$	1g
	agua destilada	950 mL

***nitratantes*:**	sol.salina estándar	50 mL
	$NaNO_3$	1 g
	$CaCO_3$	1 g
	agua destilada	950 mL

- repartir en tubos de hemólisis a razón de 1 mL por tubo, se esterilizan en autoclave, 20 minutos a 110ºC
- sembrar con 0,5 mL de cada suspensión-dilución de suelo (3 o 5 tubos/dilución)
- incubar 21 días a 28ºC

Lectura

Nitritantes: se analizan en los tubos nitritos o nitratos con reactivo difenil-amina sulfúrica (difenilamina 10 g; ácido sulfúrico 1 litro, verter sobre 200 mL agua destilada): vaciar casi completamente los tubos de modo que sólo queden 1-2 gotas, agregar a cada uno 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado y puro y 10 gotas de reactivo. *Tubos positivos:* aparición color azul intenso a altas concentraciones y fugaz a concentraciones límites

Nitratantes: detección nitratos con difenilamina sulfúrica, luego de eliminar los nitratos restantes con urea en medio sulfúrico: proceder como anteriormente, agregar unos 50 mg urea, 10 gotas de ácido sulfúrico y 10 gotas difenilamina *Tubos positivos*: intenso color azul

Nitrificación en medio sólido

Sílico-gel*:* mezclar partes iguales de sol. silicato de sodio diluído a 9ºBaumé y sol. de HCl a 13ºBaumé (verter el silicato sobre el ácido mezclando). 30 mL de la mezcla se vierten en cajas de Petri de 10 cm de diámetro que se dejan en superficie horizontal hasta formación del gel (unas 24 h), que vibra ante ligero golpe en el borde de la caja. Lavar las cajas con agua corriente disponiéndolas apiladas convenientemente en una pileta, hasta eliminación del exceso de ácido y cloruros (verificar con reactivo de nitrato de plata o colorante de azul de bromo timol). Se guardan en agua hasta su uso. Antes de su empleo se pasan unos 30 segundos por agua hirviendo, se dejan escurrir y secar y se impregnan con el medio apropiado.

Nitritantes*:* a cada caja de sílico gel se le incorpora 1 mL de solución salina estándar con 5 % de sulfato de amonio estéril. Inocular con 0,5 mL de suspensión-dilución del suelo (10^{-1} -10^{-5}) y agregar 1 mL de sol. carbonato de calcio al 40%; distribuir uniformemente y secar en estufa a 30ºC; observar a los 15-20 días la aparición de playas sobre la superficie del gel, consecuencia de la producción de ácidos nitroso y/o nítrico que solubiliza al carbonato. Se cuentan las playas como si fueran colonias

Nitrificación en suelo*:* se evalúa la **nitrificación real**, en el suelo mismo en el campo, tomando muestras periódicamente que se llevan al laboratorio, o la actividad potencial, luego de incubaciones en el laboratorio.

Nitrificación potencial: el suelo se incuba en suspensiones de suelo y agua, con *buffer* de pH 7, 2, con exceso de amonio. Se agrega clorato de sodio a los efectos de inhibir el segundo paso de la oxidación, de modo que el producto final es nitrito, que se analiza fácilmente colorimétricamente (ver Análisis Físicos y Químicos).

Desnitrificación

Recuentos en medio líquido

Medio

KNO_3	2 g
glucosa	10 g
$CaCO_3$	5 g
sol.salina estándar	1 litro

- Estirilizar 20 minutos a 110ºC

- Inocular con 1 mL de cada suspensión-dilución del suelo (10^{-1}-10^{-8}) 3 o 5 tubos por dilución, incubar a 28ºC, 7 días

- *Lectura*: pasar 2 gotas de cada tubo a tuba de hemólisis y evaluar los nitratos luego de eliminar nitritos como para nitratantes

Técnica ecológica

- incubar en condiciones de anaerobiosis (exceso de agua) muestras de suelo con agregados de nitratos y fuente de carbono (glucosa, etc.) en frascos herméticamente cerrados

- en distintos períodos de tiempo se toman muestras de suelo: determinar su pH en agua (1:2 suelo-agua), en 2 g determinar amonio, nitritos y nitratos por destilación con arrastre de vapor u otra técnica.
  Coef. de desnitrif. = (N-NO_3^- perdido/N total) x 100

- el N% de determina en los suelos por Kjeldahl (tratamiento sulfúrico en caliente)

- se puede graficar la evolución de los N-nitratos agregados, en el tiempo

Nota: Se emplea la determinación de N_2 y de N_2O en la atmósfera del suelo por cromatografía en fase gaseosa, en recipientes cerrados

Ciclo biológico del azufre

Aislamiento de microorganismos sulfatorreductores

- Puede realizarse en medio de agar simple suplementado con Na_2SO_4 0,5% y $FeSO_4$ 0,005 %, inoculando por agotamiento con muestra de suelo suspendido en agua. Incubar en la oscuridad a 25-30ºC por una o dos semanas. Se observan las colonias negras resultantes de la precipitación del SFe

Recuento en medio líquido

- **Medio** Sembrar con suspensiones-diluciones de suelo, un medio líquido con sulfatos, N mineral y un donador de H conveniente; con una porción de hierro metálico (un clavo) que asegura el ambiente reductor y permite reconocer los sulfuros formados por formación de SFe negro.

NH_4Cl	1 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4$	2 g
Na_2SO_4	0,5 g
$CaCl_2$	0,1 g
lactato de Na (al 60 %)	6 mL
agua destilada	1 litro

- Repartir en tubos de 17 cm a razón de 5 mL c/u, tapar, esterilizar

- ***Siembra*****:** si el medio salió del autoclave luego de varias horas, es necesario sacarle el aire (Baño María 20-30 minutos), enfriar e introducir en cada tubo un clavo previamente pasado por la llama y enfriado. Sembrar con 1 ml de suspensiones-diluciones de suelo (10^{-1}-10^{-8})

- ***Lectura*****:** luego de 3 semanas, positivos: en donde el clavo se rodeó de halo negro de SFe (sulfuro ferroso)

Recuento de microorganismos sulfooxidantes

Medio

K_2HPO_4	0,25 g
$MgCl_2$	0,10 g
NaCl	0,10 g
NH_4NO_3	2 g
$CaCO_3$	5 g
agua destilada	1 litro

- Repartir en tubos de ensayo a razón de 5 mL c/u, esterilizar

- Agregar a cada tubo 1 mL de sol. al 10 % de monosulfuro de sodio

- Sembrar 1 mL en cada tubo (3 o 5 tubos/dilución) de 10^{-1} a 10^{-4}

- Incubar a 28ºC y a las 3 semanas observar los tubos sin agitar, transferir 1 o 2 mL a tubo vacío y agregar: 2 gotas HCl concentrado y 5 gotas sol. acuosa $BaCl_2$ al 5 %; la presencia de sulfatos se manifiesta por aparición de **precipitado blanco** (comparar con testigo). Determinar el **NMP** como de costumbre.

Ciclo biológico del fósforo

Microorganismos que mineralizan el P-orgánico

- Sembrar por agotamiento una suspensión de suelo en agua sobre superficie sólida de medio:

extracto de levadura	2 g
glucosa	20 g
agar	15 g
fitina al 2 %	110 mL
agua	1 litro
pH	7,0

- Observar colonias rodeadas de halo transparente. Pueden emplearse otros sustratos: glicerofosfato de calcio, lecitina, etcétera

Solubilizadores de fósforo

Medio

extracto de levadura	2 g
glucosa	20 g
agar	15 g
agua	1 litro
fuente de fosfato insoluble*	2 g
actidiona al 1%	6 mL
pH	7,0

- La fuente de fosfato insoluble puede ser: fosfato tricálcico, hidroxiapatita, fosfato de roca, etcétera.

- ***Siembra*:** para recuento por siembra en inclusión se colocan 0,5 o 1 mL de las suspensiones-diluciones del suelo (10^{-1}-10^{-4}) por caja, con 3 repeticiones, se agrega el medio en sobrefusión y se incuba a 28ºC por 3 semanas

- ***Lectura*:** se observan las colonias con playas de solubilización de fósforo insoluble

Técnica ecológica de Winogradsky

En suelos deficientes en P soluble pone en evidencia la acción de los microorganismos solubilizadores por la técnica de la tierra empastada: se mezcla suelo con una fuente de C y energía (1% de almidón) y agua hasta formar una pasta sobre la que se colocan distintas fuentes de fosfatos insolubles. La solubilización permite el desarrollo de un organismo exigente como el *Azotobacter*, cuyas colonias típicas aparecen alrededor de las partículas de fosfatos

Asociaciones micorríticas

(Brundett *et al.*, 1996 ; González y Barrios, 1983 ; Honrubia *et al.*, 1992, y 1994 ; Philips y Hayman, 1970; Schenk y Perez, 1988; Sieverding, 1991)

Ectomicorrizas

- Observar macroscópicamente raíces de pinos: se aprecian raíces engrosadas, manto fúngico, muchas veces coloreado. Efectuar cortes a mano de las bifurcaciones dicotómicas con ayuda de bisturí y observar al microscopio entre porta y cubreobjeto.

- Describir hifas externas, intercelulares (red de Hartig)

Aislamiento de hongos ectomicorrícicos (figura 4)

- ***A partir de carpóforos*:** se abre cuidadosamente el sombrero y el pie del hongo y se toman fragmentos de micelio con aguja o bisturí estéril (alcohol y llama), que se siembran en medio sólido. Puede partirse de esporas que se recogen en caja de Petri sobre papel de filtro estéril, colocando el sombrero adherido a la tapa de la caja (se forma imagen en el papel)

- ***A partir de micorrizas*:** se lavan con agua corriente durante una hora, se lavan varias veces con agua destilada, se desinfectan con H_2O_2 110 vol. durante tiempo a determinar (segundos a minutos), lavar con agua estéril y depositar sobre medio sólido estéril. Incubar a 23ºC



Figura 4- Aislamiento de hongos ectomicorrícicos

- Existen numerosos medios, citaremos el de Melin-Norkrans, modificado

$CaCl_2$	0,05 g
NaCl	0,025 g
KH_2PO_4	0,5 g
$(NH_4)2HPO_4$	0,2 g
$MgSO_4\,7H_2O$	0,15 g
sol (1g citrato férrico,	0,64 g
ác.cítrico, 100 ml agua)	1 mL
HCl-tiamina	100 mg
extracto de malta	3 g
sacarosa	10 g
agar	20 g
agua destilada	1 litro

Inoculación de plantines en viveros

- Suelo y mantillo de montes establecidos

- Carpóforos picados o licuados, seleccionados en en vecindad de árboles: se seleccionana los hongos que dominan en el predio forestal bien establecido luego de picados o licuados se aplican a los plantines. Las esporas pierden viabilidad rápidamente, por lo que deben ser empleadas a la brevedad (figura 5).

- A partir de micelio de hongos seleccionados, cultivados en el laboratorio e incluídos en soportes sólidos: turba-vermiculita, frascos con granos de cebada, centeno, maíz, con medio para hongos (figura 6). El micelio se desarrolla bien rodeando a los granos que liberan sustancias promotoras del crecimiento de los hongos. Se inoculan estos granos en las macetas o tubetes junto a la semilla de pino, eucalipto, etc. otros soportes empleados son: turba, vermiculita/turba, inoculante en alginato de calcio.



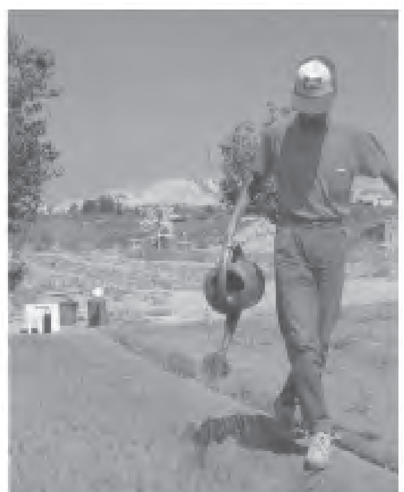


Figura 5- Inoculación de plantines forestales con carpóforos picados



Figura 6- Inoculante con hongo ectomicorrícicos con granos

Endomicorrizas

Observación (figura 7)



Figura 7- Observación de endomicorrizas arbusculares con lupa y microscopio (luego de tratamiento de las raíces)

Materiales

segmentos de raíces finas de 1 cm

KOH al 10 %

H_2O_2(10 vol)

azul de tripán 0,05 % en lactofenol

lactofenol

Técnica

- Transferir segmentos de raíz a frasco con tapa rosca de unos 15 mL, cubrir con sol. KOH al 10 %, tapar y calentar a 90ºC 1-2 h o a temperatura ambiente por 1 día (en raíces muy oscuras puede tratarse en autoclave 13-20 minutos)

- Eliminar la KOH y sumergir las raíces en H_2O_2 10 vol. 15 minutos

- Lavar con agua corriente y comprobar con HCl 0,1 N si la decoloración es correcta

- Transferir la masa de segmentos de raíz con ayuda de espátula a frasco, agregar un volumen de azul de tripán al 0,05 % en lactofenol igual al volumen de raíz durante 5 minutos

- Eliminar el colorante y adicionar lactofenol, donde pueden dejarse las raíces por mucho tiempo

- Montar entre porta y cubreobjeto un trozo de raíz coloreada, aplastarlo ligeramente para separar los tejidos

- observar a la lupa o al microscopio (10x, 40x) la presencia de arbúsculos, vesículas, esporas y sus relaciones con las células

Esta técnica clásica descripta por Philips y Hayman en 1970 ha sido simplificada obteniéndose buenos resultados:

- lavar las raíces con agua corriente para eliminar restos de suelo

- hervir las raíces en solución de KOH al 10% durante 3 minutos, en Baño María

- enjuar varias veces con agua corriente

- hervir las raíces en solución de azul de tripán (0,05% en vinagre 5%) durante 3 minutos

- enjuar varias veces en agua correinte

- observar estructuras fúngicas (vesículas, arbúsculos, esporas, hifas)

- si las raíces se cortaron en fragmentos de 1cm se puede calcular la longitud de raíz colonizada por alguna estructura de los hongos endomicorrícicos y/o calcular el % de segmentos colonizados

Extracción y cuantificación de propágulos de hongos arbusculares

Tamizado húmedo y decantación

- Una muestra de 50 g de suelo rizosférico se suspende en unos 2 litros de agua, se agita y se deja reposar durante unos segundos para que sedimenten las partículas de suelo

- Se decanta a través de una cadena de tamices de 500, 250, 125 y 53 μm, las partículas de suelo quedan retenidas en los primeros tamices

- Se recoge el sedimento retenido en cada uno de los tamices

- Se puede añadir un agente antiespumante (Tween 80 0,1-0,5%) para evitar la formación de espuma, en suelos arcillosos se puede emplear pirofosfato de sodio 0,1 M para precipitar las partículas.

En el tamiz de 500 micras quedan los trozos de raíz, en el de 250 los esporocarpos y esporas grandes, en el de 125 μm la mayoría de las esporas y en el de 53 μm las esporas pequeñas.

- Se recoge el sedimento retenido en el tamiz más pequeño y se coloca en tubos de centrífuga (unos 25 mL de sedimento con 55 ml de agua), se centrifuga 3 minutos a 895g, se tira el sobrenadante y se añade una **solución de sacarosa** a 480g/l y se centriguga 15 segundos a 895g

- Se pasa el sobrenadante por el tamiz de 53μm, lavando con agua para eliminar la sacarosa. Se observan a la lupa y se agrupan por morfología con ayuda de varilla de vidro húmeda y las claves disponibles. Se conservan hasta su empleo en frascos con agua estéril en el refrigerador (figura 8).

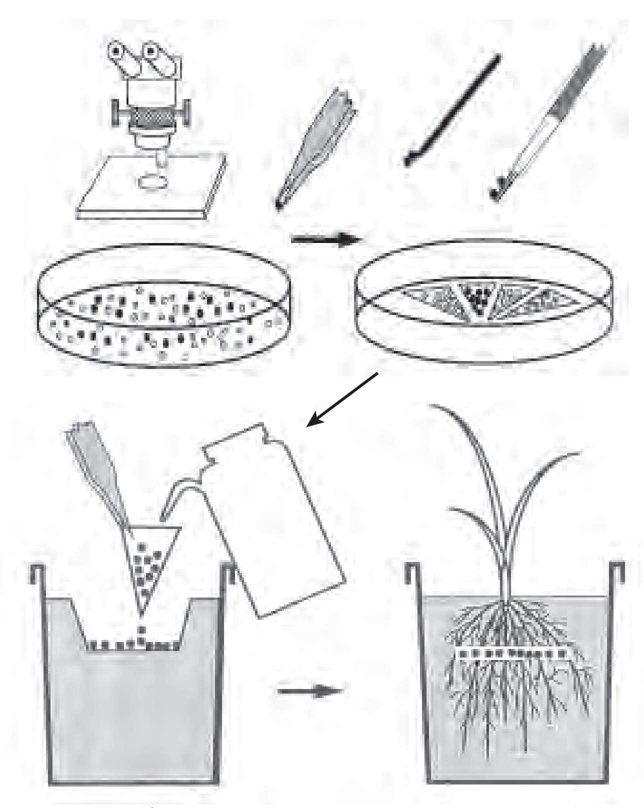


Figura 8- Selección y propagación de esporas de hongos endomicorrícicos en plantas trampa

Inoculantes

Una de las mayores dificultades en la aplicación práctica de **inoculantes** con estos cultivos es la imposibilidad del hongo para propagarse en medio de cultivo. Luego de trabajoso aislamiento de esporas a partir del suelo por técnicas de tamizado húmedo y flotación, se caracterizan las mismas según claves apropiadas (morfología, color, tipos de paredes). Cada tipo de espora se propaga en las llamadas «**plantas trampas»,** especies como sorgo, cebolla.

Técnica: el inóculo se coloca 2-3 cm más abajo donde se colocarán las semillas en macetas con mezcla de suelo y arena (1:2 v/v) con pH ligeramente ácido. A los 3-4 meses en invernáculo se observa la colonización endomicorrítica y el aumento del número de esporas en el suelo (figura 8)

- Se extraen las raíces colonizadas, se las secciona en segmentos de 1 cm: el **inoculante** está constituido por fragmentos de raíces colonizadas y esporas homogeneizadas con la mezcla suelo-arena. Se mantienen a un 50 % de la capacidad de campo y a bajas temperaturas hasta su empleo en inoculaciones experimentales en vivero. Aun no se logró propagar esta técnica a nivel de campo.

Control de maduración en los *compost*

(Dell´Abate *et al*., 1998; Mathur *et al*., 1993; Mondini *et al.,* 2003; Mustin, 1987)

Técnicas clásicas

1. Alteración de las características

- **Reducción del volumen:** la masa final de la pila debe ser por lo menos 1/3 de la del material original.

- **Coloración o aspecto**: el color inicial es ceniciento y sin brillo; con el correr del proceso la masa se va tornando más oscura y brillante cuando húmeda (como el humus). Debido a la acentuada descomposición, la mayor parte de la materia prima original no se reconoce, quedando una masa moldeable cuando se humedece.

- **El olor** característico de ciertas materias primas se va perdiendo con el compostaje que pasa a tener olor a tierra mojada, tolerable a agradable.

- **La humedad** se reduce, los que se aprecia al apretar el material con la mano: pasa de una consistencia mojada a húmeda en el inicio a casi seca cuando madura.

2. Test de maduración

Se introduce una vara de madera en la pila de *compost* durante todo el proceso. Al removerla se verifica:

- **fría y mojada**: no hay degradación, probablemente por exceso de agua en la masa

- **levemente tibia y seca**, con filamentos de micelio de hongos: la pila necesita más agua

- **caliente, húmeda y manchada de pardo oscuro**: las condiciones de compostaje son correctas

- **libre de «barro negro»**, con olor a moho, el *compost* está pronto para ser usado

3. *Test* de temperatura

Con un termómetro se puede acompañar el proceso de compostaje, midiendo la temperatura entre 40 y 60 cm de profundidad.

4. *Test* de coloides

En el compostaje la materia orgánica se va fraccionando, pasando de materiales groseros al estado coloidal, con partículas que no sedimentan cuando se hace una suspensión del material con solución de sulfato de amonio.

Otra prueba muy sencilla: se toma una muestra del *compost* en la palma de la mano y se agrega agua suficiente para formar una pasta, que debe ser trabajada con la punta de los dedos, amasándola. Separando las manos se puede observar:

- ***Compost* crudo**: las palmas de las manos estarán prácticamente limpias porque el material se desprendió en partículas sueltas.

- ***Compost* semimaduro:** pequeña parte de la muestra permanecerá en las manos, coloreándolas de marrón.

- ***Compost* maduro:** las palmas de las manos se mostrarán como se estuviesen recubiertas por una grasa negra. Lavándolas, el agua tomará una coloración negra, como el **humus**, cosa que no ocurrirá con el compost semimaduro.

5. *Test* del pH

Midiendo el pH durante el compostaje, se puede saber como se desarrolla la descomposición, principalmente si los datos se asocian a otros *tests*.

- Si el material es ácido, con pH inferior a 6,0 el *compost* puede ser considerado crudo, en fase inicial de degradación.

- Si es neutro a levemente alcalino (6,0-7,6) el *compost* se encuentra en la fase de bioestabilización, o sea, semimaduro.

- Los pH superiores a 7,6, son característicos de *compost* bioestabilizado, en proceso de humificación.

6. Test de nitrógeno mineral

Para indicar la presencia de amonio o de nitrato en el *compost*, que caracterizan fases en el compostaje: una muestra de *compost* se humedece con agua destilada y se presiona sobre un papel de filtro. El papel de filtro con la solución del *compost* se divide en dos partes para analizar amonio y nitratos:

a. Test para amonio: en una de las mitades del disco de papel de filtro se colocan gotas de reactivo de Nessler: si el reactivo toma color pardo, indica presencia de amonio, lo que significa que el *compost* no está maduro, si no cambia de color, no hay amonio, y se procede al *test* siguiente:

b. *Test* para nitrito y nitrato: en la otra mitad del disco de papel, agregar gotas de α naftilamina (0,1g en 250 mL de ácido acético al 20%) y gotas de ácido sulfanílico (1,5 g en 250 ml de ácido acético al 20%) (reactivo de Gries): si aparece color **rojo** es porque hay nitrito, si no se colorea, se agrega una pequeña cantidad de polvo reductor (Zn en polvo); si hay nitratos, serán reducidos a nitritos que dan color rojo, en un corto intervalo.

Un *compost* bien maduro presenta **nitratos** en abundancia y apenas trazas de amonio; un compost semimaduro tiene amonio y no hay nitratos.

Si la muestra presenta amonio y nitratos, es porque se trata de una mezcla de abonos con distinto tiempo de preparación, o que se han agregado fertilizantes minerales. Con trazas de nitrato o amonio, el *compost* se encuentra en fase intermedia de fermentación, en la cual casi todo en nitrógeno está en forma de proteína (nitrógeno orgánico).

7. *Test* para almidón

Tres tipos de carbohidratos son encontrados en el *compost*: azúcares, almidón y celulosa. Los azúcares son los primeros componentes en ser metabolizados, generalmente en una semana; el almidón en la cuarta a quinta semana ya está en la fase máxima de descomposición y el *compost* está bioestabilizado, con olor más tolerable y con apariencia modificada; el pH debe ser alcalino y la celulosa estará presente. Se toma 1 g de *compost* en un vaso de 100 ml se moja con algunas gotas de etanol si el *compost* estuviera seco y se agrega 20 mL de ácido perclórico al 36%. Se agita 5 minutos y se filtra. Se agrega 2 mL de **solución de iodo** al filtrado y se agita. Se colocan algunas gotas en una placa de vidrio y se examina la coloración y la cantidad de precipitado formado.

- **Coloración amarilla y poco precipitado**, significa compost maduro.

- **Coloración azul intenso y fuerte precipitado**, *compost* pobre y no maduro.

La secuencia de coloración para el proceso de compostaje es la siguiente: azul oscuro, azul claro, ceniza, verde y amarillo. La coloración roja se encontrará en *composts* parcialmente degradados.

Técnicas cuantitativas de evaluación de la biomadurez

Evaluación de sustancias tipo humus- "Indices de humificación"

Son numerosas las correlaciones entre parámetros físicos y químicos con los biológicos. Entre los primeros, el nivel y la calidad de la materia orgánica de los *compost* han recibido mucha atención y son empleados numerosos índices que relacionan el grado de madurez de la fracción orgánica.

Se extrae la materia orgánica y se determinan distintos índices que reflejan el grado de madurez de los *compost* (Kalbitz y Geyer, 2001). La técnica de Mondini *et al.* (2003) determina dos índices evaluando el C-orgánico de distintas fracciones.

No corresponde hablar de sustancias húmicas en los *compost* por el período de tiempo requerido para su síntesis, de cientos a miles de años en los suelos, pero los autores analizan el grado de madurez de la materia orgánica de los *compost* y para ello, como en los estudios del humus, extraen la materia orgánica estabilizada "tipo humus" con solución alcalina y evalúan la absorbancia a distintas longitudes de onda.

Se sabe que la materia orgánica más polimerizada, del tipo de los ácidos húmicos, absorbe sobre todo en el ultravioleta (280nm), mientras que la menos polimerizada (humus en vías de formación, materia orgánica fresca) lo hace a longitudes de onda más larga. Se interpretan los cocientes de extinción como índices del estado de polimerización de la materia orgánica.

- Extracción del C-orgánico con 0,1M NaOH + 0,1M $Na_4P_20_7$ a 65º por 24 horas
- Centrifugar a 5.000g y filtrar el sobrenadante por filtro millipore de 0,20μ (CTE=Ctotal extraído)
- La fracción tipo ácidos húmicos (AH) se separa de la fracción tipo ácidos fúlvicos (AF) y la no humificada (NH) por precipitación luego de acidificación de la solución alcalina a pH menor de 2,0
- NH se separa de la AF por cromatografía en columna de PVP (polivinilpirrolidona)
- AF se combianan con AH (fracción AH+ AF)
- El C-orgánico de cada fracción (CTE, NH, AH, AF) se determina por oxidación con dicromato de potasio en caliente (Walkey y Black)

1) Indice de humificación (IH) = $\frac{NH}{AH + AF}$

2) Grado de humificación (GH%) = $\frac{AH + AF}{CTE}$ X 100

Otro índice (Campitelli *et al.,* 2005)
- 1 g de suelo + 50 mL NaOH 0,5N se agitan 2 horas en agitatador eléctrico
- Dejar toda la noche en reposo
- Centrifugar 25 minutos a 3.000rpm
- Leer la absorbancia del sobrenadante a: 280nm, 472nm y 664nm
- Calcular relaciones:
  Q 2/4 = Ab280/Ab472
  Q 4/6 = Ab472/Ab664
  Q 2/6 = Ab280/Ab66

Estas técnicas se combinan con datos termoanáliticos y colorimétricos a los efectos de evaluar la maduración y estabilidad de un *compost* (Dell´Abate *et al.*, 1998) permitiendo distinguir compuestos pobremente estabilizados de los más evolucionados. Se correlacionan, además con el índice de humificación (IH) y el grado de humificación (GH).

Bibliografía

Alef, k. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. 1998, Alef y Nannipieri. (eds) Academic Press, N.York: 232-233

Aman, R. I. Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology, 1995, Mol. Ecol 4: 543-554

Balatti, A. y Jardim Freire, J. **Legume inoculants. Selection and characterization of strains. Production, Use and Management,** 1996 Ed. Kingraf, La Plata, Argentina, 148 pp

Bremner, J.M., 1965 Total nitrogen e inorganic nitrogen. En: **Methods of soil analysis,** Black (ed.), Amer. Soc. of Agronomy: 1149-1178 y 1179-1237

Brookes, P. C., Powlson, D. S., Jenkinson, D. S. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. 1982 Soil Biol. Biochem. 14: 319-329

Brookes, P. C., Landman, A., Pruden, G., Jenkinson, D. S. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. 1985 Soil Biol Biochem 17: 837-842

Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T. y Malajczuk, N. **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**, 1996, Aciar monograph 32 : 374 pp, Csiro, Canberra

Burket, J. Z y R. P. Dick Microbial and soil parameters in relation to n mineralization in soils of diverse genesis under differing managements systems. 1998 Biol & Fertil Soils 27:430-438

Campitelli, P., Velasco, M. y Ceppi, S. Evaluación de la calidad de *compost:* parámetros químicos y espectroscópicos. 2005, XIV Congreso Argentino de Físico Química y Química Inorgánica, Termas del Río Hondo, Santiago del Estero

Cochran, W. G. Estimation of bacterial densities by means of the most probable number, 1950, En: **Biometrics,** 6: 105-116

Curso Práctico de Microbiología General, 2000, Facultad de Química y en www.fq.edu.uy/microbio/micrgeneral

Dell´Abate, M. T., Canali, S., Trinchera, A., Benedetti, A., and Segui, P. Thermal analysis in the evaluation pf compost stability: a comparison with humification parameters. 1998 En: **Nutrient cycling in Agroecosystems**, Kluver Academic Publishers: 217-224

Döbereiner, J. Forage grasses and grain crops 1980 En: **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**, F. J. Bergersen. Wiley & Sons: 535-555

Duhoux, E. y Nicole, M. **Biologie Végétale: Associations et interactions chez les plantes**. 2004, Dunod, París

Dunbar, J., Ticknor, L. O. and Cheryl, R. Phylogenetic specificity and reproducibility and new methods for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. Applied & Environm. Microbiol. 67(1): 190-205

Eckhardt, T. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. 1978 Plasmid 1: 584-588

FAO **Technical handbook on symbiotic nitrogen fixation legume/rhizobium**, 1983, Roma

FAO **Legume inoculants and their use,** 1984, Roma

Ferrari, V. Análisis de la diversidad estructural y funcional de comunidades microbianas del suelo, 2005 Trabajo Especial I de la Lic. de Bioquímica de la Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, 70 pp

Fisher and Yates **Statistical tables**, 4ª ed., 1953, Oliver & Boyd, Londres

Frioni, L. , A. Spinelli y A. Maggi Nodulación y fijación de nitrógeno en especies de *Casuarina y Allocasuarina* cultivadas en el país. 1991 Bol. Inv. Fac. Agr. 30: 1-20

Frioni, L., Le Roux, C., Dommergues, Y. R. and Diem, I. H. G. Inoculant made of encapsulated *Frankia*: assessment of F*rankia* growth withing alginate beads. 1994, World J. Microbiol. & Biotech 10: 118.121

Frioni, L. **Procesos microbianos**.1999 Fundación de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina, tomo II

Garland, J. Methods of Microbial Community Análisis, 2004, Curso de post grado dictado en la Facultad de Agronomía de la UBA, Jornadas de Biología, mayo, Buenos Aires

Gonzalez, S. y Barrios, S. R. A. Producción de inóculo de micorrizas arbusculares, 1983, Rev. Latinoam. Microb., 25: 181-187

Graham, P.H. and Vance, C.P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. 2000 Field Crops Res. 65 (2): 93-106

Guía de Clases Prácticas de Microbiología, 2005, AEA, Facultad de Agronomía y en www.fagro.edu.uy/microbiologia

Hitzl, W., Henrich, M., Kessel, M. and Insam, H. Application of multivariate analysis of variance and related techniques in soil studies with substrate utilization tests, 1997 J. of Microbiol Methods 30: 81-89

Honrubia, M., P., Torres, P, Diaz, G. y Cano, A. **Manual para micorrizar plantas en viveros forestales.** 1992. ICONA Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. LUCDEME VIII, Monografías 54, 45 pp

Honrubia, M., P., Torres, P, Diaz, G. y Morte, A. **Biotecnología forestal: técnicas de micorrización y micropropagación de plantas**, 1994 Universidad de Murcia, Ciheam, Instituto Agronómico Mediterrámneo de Zaragoza, Murcia, 168 pp

Josephson, K. and Pepper, I. Molecular genetic analysis in soil ecology, 1998. En: **Principles and Applications of Soil Microbiology**, Sylvia, Fuhrmann, Hartel y Zuberer (eds), Prentice Hall.

Jenkinson, D.S. and Powlson, D.S. The effect of biocidal treatments on metabolism in soil. V-a method for measuring soil biomass, 1976, Soil Biol. Biochem., 8: 209-213

Kalbitz, K. and Geyer, W. Humification indices of water-soluble fulvic acids derived from synchronous fluorescence spectra-effects of spectrometer type and concentration-. 2001 J. of Plant Nutrition & Soil Sci. 164(3):259-265

Komalchuk, G. A., de Bruijin, F. J., Head, I. M., Akkermans, A. D. L. and Van Elsas, J. D. **Molecular Microbial Ecology Manual**. 2004, Springer, 1780 pp.

Lassagno, M. y Frioni, L. Obtención de mutantes de *rhizobium meliloti* resistentes a antibióticos. 1988 Bol. Inv. Fac. Agron., N° 17:1 - 12. Montevideo

Lehman, R. M., Colwell, F. S.. Ringelberg, D. B. and White, D. C. Combined microbial community-level

analysis for quality assurance of terrestrial subsurface cores, 1995, J. of Microbiol. Methods 22:263-281

Mathur, S.P., Owen, G., Dinel, H. and Schnitzer, M. Determination of compost biomadurity, 1993 Biological Agric. & Horticulture 10:65-85

Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L. and Ghiorse, W. C. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples.1999, Appl & Environ. Microbiol 65(1): 4715-4724

Milnitsky, F., Frioni, L. and Agius, F. Characterization of rhizobia that nodulate native legume trees from Uruguay, 1997, Soil Biol Biochem 29(5-6):289-292

Mondini, C., Dell´Abate, M. T., Leita, L. and Benedetti, A. An integrated chemical, thermal and microbiological approach to compost stability evaluation, 2003 J. Environ. Qual 32:2379-2386

Mustin, M. **Le compost: Gestion de la matière organique,** 1987, François Dubusc (ed), París: 954 pp

Nelson, D. W. and Sommers, L. E. Total carbon, organic carbon and organic matter. 1982 En: **Methods of soil analysis,** parte 2.. Am. Soc. Agron. Soil Sci. Soc. Am. Madison, Wisconsin

Niftal, **International network of legume inoculation,** Niftal Project, 1981, Univ. Hawaii, US Agency for Int. Development

Paul, E. A. and Clark, F. E **Soil Microbiology and Biochemistry,** 2nd. Ed. 1996, Academic Press

Philips, J.M. and Hayman, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizae for rapid assesment of infection, 1970 Trans. Br. Mycol. Soc., 55 : 158-161

Pinkart, H. C., Ringelberg, D. B., Piceno, Y. M., Macnaughton, S. J. and White, D. C., **Manual of Environmental Microbiology,** 2002, ASM Press, Washington, D. C.

Robertson, G. P., Coleman, D. C., Bledsoe, C. S. and Sollins, P. **Standard Soil Methods for long- term Ecological Research,** 1999, Oxford, Univ. Press

Rodríguez, A. y Frioni, L. Caracterización de rhizobios que nodulan leguminosas arbóreas nativas de Urugau por la técnica *rep-PCR*, 2003, Revista Argentina de Microbiología 35 :193-197

Roose-Amsaleg, C. L., Garnier-Sillam, E. and Harry, M. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. 2001, Applied Soil Ecology 18 :47-60

Saano, A. and Lindström, K. Isolation and indentification of DNA from soil. 1995. En : **Methods of Applied Soil Microbiology and Biochemistry**, Alef and Nannipieri (eds). Academic Press

Schinner, F., Ohlinger, R, Kandeler, E. and Margesing, R. **Methods in Soil Biology**. 1996, Springer, Germany, 426 pp

Schenk, N. C. and Perez, Y. **Manual for the identification of v-a mycorrhizal fungi,** 1988, Ganesville, University of Florida, 241 pp

Schneider, M. and de Bruijn, F. J. *Rep-pcr* mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer assisted phylogenetic pattern analysis. 1996, J. of Microb. & Biotech 12: 163-174

Sieverding, E. **Vesicular-arbuscular mycorrhizal management in tropic agrosystems.** 1991, Eschborn, gtz, Gmbh, 371pp

Somasegaran, P., Hoben, H. and Halliday, J. **Niftal manual for methods in legume-rhizobium technology***,* 1982, Univ. Hawaii College of Trop. Agr. and Human Resources, US Agency for Int. Development

Stowers, M. D. Collection, isolation, cultivation and maintenance of *Frankia*, En: **Symbiotic nitrogen fixation technology***,* 1987, Elkan, G. H. (ed.), Marcel Dekker, Nueva York: 29-53

Vance, E. D., Brookes, D. S. and Kenkinson, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. 1987 Soil Biol Biochem. 19: 703-707

White, D. C. and Macnaughton, S. J. Chemical and Molecular Approaches for Rapid Assessment of the Biological Status of Soils. 1998, En: **Biological Indicators of Soil Health,** CAB International

Wilson, K. H., Wilson, W. J., Radosevich, J. L., De Santis, T. Z. and Viswanathan, V. S. High-density microarray of small ribosomal DNA probes. 2002, Applied & Environ. Microbiol. 68:2535-2541

Zelles, L. Fatty acid patterns of microbial phospholipids and lipopolysaccharides 1996, En: **Methods in Soil Analysis**, Springer-Verlag, Berlín: 80-92

Zelles, L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial community in soil: a review. 1999, Biology and Fertility of Soils 29: 111-129

Se terminó de imprimir en mayo de 2006
en el Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía
Universidad de la República
Montevideo - URUGUAY